

Aus der
Klinik für Kleintiere (Chirurgie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer
und
der Abteilung für Neuroradiologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. M.A. Brockmann

**In vivo Bildgebung von Gehirntumoren im Glioblastom-Modell bei der Maus
und Evaluation der Verteilung von Mikrosphären in einem Aneurysma-Modell
beim Schwein mittels Mikro-CT**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Stefanie Kirschner
Tierärztin aus Mannheim

Mannheim 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. M. Kramer
Univ.-Prof. Dr. M.A. Brockmann

Tag der Disputation: 11.01.2016

Meiner Mutter in Dankbarkeit gewidmet

Zwei Publikationen, die im Rahmen dieser kumulativen Dissertation entstanden sind:

Publikation 1 (Erstautorenschaft):

Stefanie Kirschner, Manuela C. Felix, Linda Hartmann, Miriam Bierbaum, Máté E. Maros, Hans U. Kerl, Frederik Wenz, Gerhard Glatting, Martin Kramer, Frank A. Giordano, Marc A. Brockmann_(2015). **“In vivo micro-CT imaging of untreated and irradiated orthotopic glioblastoma xenografts in mice: capabilities, limitations and a comparison with bioluminescence imaging.”** *Journal of Neuro-Oncology*. 2015 Apr; 122(2):245-54

Publikation 2 (Co-Autorenschaft):

Andrea Nonn, **Stefanie Kirschner**, Giovanna Figueiredo, Martin Kramer, Omid Nikoubashman, Rastislav Pjontek, Martin Wiesmann, Marc A. Brockmann (2015). **“Feasibility, safety, and efficacy of flow-diverting stentassisted microsphere embolization of fusiform and sidewall aneurysms.”** *Neurosurgery*. 2015 Feb 14. [Epub ahead of print]

Weitere eigene Publikationen, die in dieser Arbeit nicht näher erläutert werden:

Publikation 3 (Co-Autorenschaft):

Giovanna Figueiredo, Teresa Fiebig, Stefanie Kirschner, Omid Nikoubashman, Lisa Kabelitz, Ahmed Othman, Andrea Nonn, Martin Kramer, Marc A. Brockmann (2015). **“Minimally invasive monitoring of chronic central venous catheter patency in mice using digital subtraction angiography (DSA).”** *PLoS One*; zur Publikation akzeptiert

Publikation 4 (Co-Autorenschaft):

Manuela C. Felix, Jens Fleckenstein, Stefanie Kirschner, Linda Hartmann, Frederik Wenz, Marc A. Brockmann, Gerhard Glatting, Frank A. Giordano (2015). **“Image-Guided Radiotherapy Using a Modified Industrial Micro-CT for Preclinical Applications.”** *PLoS One*. 2015 May 19; 10(5):e0126246

Publikation 5 (Co-Autorenschaft):

Anika Suske, Antje Pöschke, Patricia Schrock, Stefanie Kirschner, Marc A. Brockmann, Carsten Staszky (2015). **“The infundibula of equine maxillary cheek teeth, Part 1: Development, blood supply and infundibular cementogenesis.”** *The Veterinary Journal*; eingereicht

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 7 |
| Literaturübersicht..... | 10 |
| 1.1. Die Bedeutung von Tierversuchen für die Wissenschaft..... | 10 |
| 1.2. Möglichkeiten zur Reduktion der Versuchstierzahl..... | 11 |
| 1.3. Die Maus als Versuchstier..... | 13 |
| 1.4. Techniken zur in vivo-Schnittbildgebung von Mäusen..... | 14 |
| 1.4.1. Mikro-CT..... | 14 |
| 1.5. Ziel der vorliegenden Arbeiten..... | 19 |
| Publikationen | 20 |
| 1.6. Erstautorenschaft..... | 20 |
| 1.7. Co-Autorenschaft..... | 22 |
| 1.8. Weitere eigene Publikationen..... | 24 |
| 1.8.1. Image-Guided Radiotherapy Using a Modified Industrial Micro-CT for Preclinical Applications..... | 24 |
| 1.8.2. Minimally invasive monitoring of chronic central venous catheter patency in mice using digital subtraction angiography (DSA) | 26 |
| 1.8.3. The infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1: Development, blood supply and infundibular cementogenesis..... | 29 |
| Übergreifende Diskussion | 31 |
| Zusammenfassung..... | 43 |
| Summary | 45 |
| Literaturverzeichnis..... | 47 |
| Danksagung..... | 58 |
| Erklärung | 59 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| AnimAlt-ZEBET | Datenbank der ZEBET über Alternativmethoden zu Tierversuchen |
| BfR | Bundesinstitut für Risikobewertung |
| BLI | Bioluminescence imaging |
| BMBF | Bundesministerium für Bildung und Forschung |
| BMEL | Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CFD | Computational fluid dynamics |
| DFG | Deutsche Forschungsgesellschaft |
| °C | Grad Celsius |
| CNC | Central nervous system, Zentralnervensystem |
| CT | Computertomographie |
| DICOM | Digital Imaging and Communications in Medicine, Digitale Bildverarbeitung und -kommunikation in der Medizin |
| DIMDI | Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DRZE | Deutsches Referenzzentrum für Ethik und Biowissenschaften |
| e.g. | exempli gratia (lateinisch „zum Beispiel“, „for example“) |
| et al. | et alii (lateinisch „und andere“, „and others“) |
| EU | Europäische Union |
| °F | Fahrenheit |
| FBS | Fetal bovine serum, Fetales Kälberserum |
| FDS | Flow diverter stent |
| Fig. | Abbildung, figure |
| FWHM | Full Width at Half Maximum, Halbwertsbreite |
| f/stop | Blendenzahl |
| G | Gauge |
| g | Gramm, gram |
| GBM | Glioblastoma multiforme |

| | |
|-----------------|--|
| GEKID | Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. |
| GEMM | Genetically Engineered Mouse Model, genetisch veränderte Mausmodelle |
| GFP | Green fluorescent protein |
| Gy | Gray |
| h | hour(s), deutsch: Stunde(n), |
| i. d. R. | in der Regel |
| i. e. | id est (lateinisch „das heißt“, “that is“) |
| IGRT | Image-guided radiotherapy, bildgeführte Strahlentherapie |
| i. v. | intravenös, intravenous |
| keV | Kiloelektronenvolt, kiloelectron volt |
| kg | Kilogramm, kilogram |
| kV | Kilovolt, kilovolt |
| MEDSUM | MEDLINE Summary Tool |
| MG | Malignant Glioma |
| MOI | Multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion |
| MRI | Magnetic Resonance Imaging, Magnetresonanztomographie |
| MWCO | Molecular weight cut-off, Ausschlussgrenze von Ultrafiltrationsmembranen |
| mGy/s | Milligray/Sekunde, milligray/second |
| mg | Milligramm, milligram |
| min | Minute(n), minute(s) |
| mm | Millimeter, millimeter |
| mm ³ | Kubikmillimeter, cubic millimeter |
| n | Gruppengröße |
| NOD | Non-obese diabetic |
| NPV | Negativer prädiktiver Wert, negative predictive value |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development |
| o. g. | oben genannt |
| <i>P</i> | <i>P</i> -Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit), <i>P</i> -value |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung, phosphate buffered saline |
| PET | Positron emission tomography, Positronen-Emissions-Tomographie |

| | |
|----------------|---|
| PPV | Positiver prädiktiver Wert, positive predictive value |
| RAW-Data | primary data, Rohdaten |
| RKI | Kobert Koch-Institut |
| r_s | Spearman's Rangkorrelationskoeffizient |
| s | Sekunde(n), second(s) |
| SCID | Severe combined immunodeficiency |
| SET | Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen |
| SNR | Signal-Noise-Ratio |
| sog. | sogenannt |
| Spearman's Rho | Spearman's Rangkorrelationskoeffizient |
| SPECT | Single-photon emission computed tomography, Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie |
| u.a. | unter anderem |
| V | Volumen, volume |
| vfa | Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V. |
| v. a. | vor allem |
| W | Watt, watt |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZEBET | Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch |
| ZfKD | Zentrum für Krebsregisterdaten |
| μAs | Mikroampere-Sekunde, microampere-second |
| μg | Mikrogramm, microgram |
| μl | Mikroliter, microlitre |
| μm | Mikrometer, micrometer |

Literaturübersicht

1.1. Die Bedeutung von Tierversuchen für die Wissenschaft

Die Verwendung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken und die damit einhergehenden Tierversuche werden v. a. zur Erforschung von physiologischen Prozessen, zur Entwicklung neuer Therapien und u.a. zur Überprüfung der Produktsicherheit durchgeführt. Hierfür stellen Mäuse und Ratten zusammen sowohl in Deutschland (2011: 84 %, 2013: 86 %), als auch in Europa (2011: 75 %) die größte Versuchstiergruppe dar, wobei der Anteil an Mäusen im Bezug auf die Gesamttierzahl 73 % beträgt [1].

Die Anzahl der verwendeten Versuchstiere ist in Deutschland in den letzten Jahren stetig angestiegen [1]. Der Tierschutzbericht der Bundesregierung gibt an, dass die Gesamtzahl der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltieren zwischen den Jahren 2000 und 2010 von 1 825 215 auf 2 856 316 Tiere angestiegen ist. 2012 war ein weiterer Anstieg auf 3 080 727 Versuchstiere zu verzeichnen, was gegenüber dem Jahr 2011 mit 2 911 705 Tieren, eine Steigerung von 5,8 % bedeutet. Gründe für den Anstieg liegen im vermehrten Einsatz von Tieren für die biologische Grundlagenforschung (+11,8 %) und für Qualitätskontrollen medizinischer Produkte (+2,6 %). Rückläufig war hingegen die Zahl der Versuchstiere sowohl für toxikologische Untersuchungen bzw. Sicherheitsprüfungen (-4,6 %), als auch in der Erforschung und Entwicklung von Produkten und Geräten für die Human-, Zahn- und Veterinärmedizin (-8,8 %). Obwohl in einigen Bereichen, wie z.B. in der human-, zahn- und veterinärmedizinischen Forschung die Versuchstierzahlen rückläufig sind, werden in der biologischen Grundlagenforschung seit einigen Jahren vermehrt Tierversuche durchgeführt. So entfiel in 2011 der größte Teil der eingesetzten Versuchstiere mit 46,1 % auf diesen Bereich. Grund hierfür ist die hohe Verfügbarkeit verschiedener transgener Tiermodelle (v. a. Mäuse und Ratten), die inzwischen 30 % aller Versuchstiere ausmachen. Durch ihren Einsatz ergeben sich neue Möglichkeiten für die Erforschung verschiedenster Erkrankungen [1].

Im Jahr 2013 ist in Deutschland die Zahl der für Tierversuche eingesetzten Tiere erstmals gesunken [2]. So wurden 2 997 152 Wirbeltiere in Tierversuchen eingesetzt, was gegenüber dem Jahr 2012 ein Rückgang um 2,7 % bedeutet. Diesen Rückgang führt das BMEL auf den geringeren Einsatz von Tieren für toxikologische Sicher-

heitsprüfungen (-7,6 %) zurück. Dennoch ist anzumerken, dass die Anzahl der für die Forschung eingesetzten Versuchstiere nur 0,5 % aller Tiere ausmacht, die jährlich in Deutschland getötet werden. 99,5 % der Tiere werden v. a. für die menschliche Ernährung getötet [3].

1.2. Möglichkeiten zur Reduktion der Versuchstierzahl

Unter Alternativmethoden zum Tierversuch gemäß dem 3R-Konzept von Russel und Burch (1959) sind Testverfahren zu verstehen, die entweder Tierversuche vollständig ersetzen (*Replacement*) oder – falls dies nicht möglich ist – zumindest eine Reduzierung der Anzahl der verwendeten Tiere (*Reduction*) bzw. eine Minderung des Belastungsgrades der Tiere (*Refinement*) erlauben. Russel und Burch haben das Prinzip der „3R“ in ihrem Buch „The Principles of Human Experimental Techniques“ veröffentlicht.

Soweit möglich, werden aus ethischen Gründen Tierexperimente (in vivo-Methoden) durch alternative Methoden (in vitro-Methoden) ersetzt. In vitro-Verfahren gewinnen in der Forschung zunehmend an Bedeutung und werden vermehrt mit staatlichen Mitteln und durch Stiftungen gefördert (DFG, BMBF, BfR, SET). Das BfR hat seit Beginn eines Förderungsprogrammes für die Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch im Jahre 1990 mehr als 100 Forschungsprojekte unterstützt. Zeitgleich werden ca. zehn Arbeitsgruppen mit durchschnittlich 35 000 Euro jährlich bei einer Laufzeit der Projekte von jeweils ein bis drei Jahren gefördert. Die Begutachtung von eingereichten Anträgen auf Förderung erfolgt durch die „Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch“ (ZEBET) am BfR.

Die moderne Schnittbildgebung bietet die Möglichkeit, Tierversuche im Hinblick auf die Effektivität neuer Behandlungsansätze im longitudinalen Verlauf zu evaluieren [4-6]. Durch Bildgebungstechniken wie Mikro-CT können die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Versuchsvorhabens repetitiv in vivo untersucht werden [7, 8]. Somit kann die Tierzahl deutlich reduziert werden, da auf eine große Anzahl an Finalversuchen zuvor festgelegter Gruppen zu vordefinierten Zeitpunkten verzichtet werden kann [9, 10]. Ein weiterer Vorteil liegt in der exakten Lage- und Größenbestimmung, z. B. eines Gehirntumors, mittels dreidimensionaler Bildgebungsverfahren [8, 11, 12]. Ausgangsdaten wie Dauer bis Tumordetektion nach Xenotransplantation,

Tumorzvolumen und Durchmesser können genau bestimmt werden und mit im zeitlichen Verlauf dokumentierten Daten verglichen werden [13]. Auch diese Möglichkeiten reduzieren die Anzahl an Versuchstieren, da verschiedenste Daten während des gesamten Versuches ermittelt und die Tiere dementsprechend in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Dennoch können nicht alle Fragestellungen durch in vitro-Experimente geklärt werden [14]. Zum Beispiel lässt sich die Regulation des Tumorwachstums und insbesondere auch der Tumorangiogenese nur sehr begrenzt in vitro erforschen [15]. Es gibt kein geeignetes in vitro-Modell, in dem ein wachsender dreidimensionaler Tumor in eine Umgebung eingebracht werden kann, die in ihrer Komplexität dem Gewebe in vivo entspricht und gleichzeitig die komplexen Vorgänge bei der Therapie simuliert [15, 16]. Bei der Untersuchung dieser komplexen Mechanismen ist man deshalb auf Tiermodelle angewiesen. Alternativmethoden für diese Versuchsanordnung sind derzeit nicht verfügbar.

Dies gilt auch für Modelle zerebraler Aneurysmen. Neue Methoden zur Embolisation müssen abgesehen von in vitro-Modellen zusätzlich in vivo am Tier auf ihre Sicherheit überprüft werden [17, 18]. Nach dem Medizinproduktegesetz müssen neue Medizinprodukte in Europa CE-zertifiziert sein und die Anforderungen der Richtlinie 93/42/EWG erfüllen. Die Verordnung über Medizinprodukte schreibt „zur Bewertung der biologischen Verträglichkeit von Medizinprodukten biologische Sicherheitsprüfungen mit Tierversuchen vor“ (§ 2 Biologische Sicherheitsprüfung). Eine direkte Erprobung neuer Medizinprodukte am Menschen ist illegitim, da ein erhebliches Risiko unvorhersehbarer Schäden bis hin zum Tod bestünde. Das Blutkreislaufsystem des Menschen lässt sich hinsichtlich seiner normal-anatomischen Variationen, Hämodynamik, Scherkräfte und Gewebsreaktionen nach Behandlung bisher noch nicht für jede Fragestellung simulieren. Keines der zurzeit verfügbaren Modelle weist alle notwendigen Merkmale eines idealen Aneurysmen-Modells auf [18]. Es besteht die Notwendigkeit, Fortschritte bei der Entwicklung neuer Aneurysmen-Modelle zu erzielen, um neue Techniken zur Embolisation entwickeln und neue Materialien testen zu können [18].

1.3. Die Maus als Versuchstier

Die Maus ist mit 73 % (BMEL) das in Deutschland am häufigsten eingesetzte Versuchstier. Hierfür gibt es mehrere Gründe: Zum Einen besteht eine relativ starke genetische Übereinstimmung zwischen Maus und Mensch, was eine Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse von der Maus auf den Menschen in einem relativ hohen Maße zulässt [2]. Ebenso wie das menschliche Genom ist das Maus Genom mittlerweile vollständig bekannt [3]. Weiterhin reproduzieren sich Mäuse außerordentlich schnell und mit großen Wurfzahlen und sind daher schnell in großen Mengen verfügbar[19]. Hinzu kommt die unkomplizierte, platzsparende und v. a. relativ kostengünstige Haltung dieser Tiere.

Darüber hinaus sind viele verschiedene Mauslinien kommerziell verfügbar. Für nahezu alle Bereiche und Fragestellungen in der Forschung stehen hochspezifische Zuchtlinien zur Verfügung [20, 21]. Mit Hilfe genetisch veränderter Tiere können sowohl grundlegende biologische Mechanismen, als auch Zusammenhänge zwischen bestimmten Krankheitsbildern und genetischen Veränderungen untersucht sowie Modelle menschlicher Krankheitsbilder erzeugt und pharmakologische Fragestellungen analysiert werden [3, 6]. Die Maus wird für die Erforschung von Gehirntumoren sehr häufig und erfolgreich eingesetzt, was die Vergleichbarkeit der Daten erhöht. Anhand von Mausmodellen können Tumorphysiologie und grundlegende molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und Progression untersucht werden [6, 22]. Auch wir haben für unsere in vivo Versuche die Maus als Versuchstier gewählt, da die Biologie und Immunologie dieser Tiere gut erforscht ist [20]. Aufgrund ihrer geringen Größe erfordert die Forschung mit Mäusen spezielle Geräte und Methoden [23]. Dies gilt auch für die Schnittbildgebung. Zwar existieren bereits in vivo-Studien zum Einsatz der Mikro-CT im Glioblastom-Ratten-Modell [24-27], jedoch beschreiben bisher nur wenige Studien die alleinige Anwendbarkeit eines Mikro-CT für ein Hirntumormodell bei der lebenden Maus [28-31]. Kontrollierte Studien zur diagnostischen Sicherheit der Mikro-CT im Glioblastommodell in der lebenden Maus lagen bisher nicht vor.

1.4. Techniken zur in vivo-Schnittbildgebung von Mäusen

Für longitudinale Studien ist die Weiterentwicklung nicht-invasiver Untersuchungstechniken zur Anwendung am lebenden Tier essentiell [7, 8, 10, 23]. Nur so ist es mit Blick auf Hirntumoren möglich, Krankheits- oder Therapieverläufe an ein und demselben Tier über einen längeren Zeitraum zu dokumentieren und die Wirksamkeit von neuartigen Therapieformen suffizient zu überprüfen [6]. Hinzu kommt, dass durch repetitiv anwendbare Untersuchungstechniken die Anzahl der Tiere für das Versuchsvorhaben reduziert werden kann, was im Sinne des bereits oben diskutierten 3R-Prinzips ist [10].

Seit einigen Jahren werden im Bereich der Kleintierbildgebung besondere Fortschritte erzielt [32-34]. Mittlerweile sind verschiedenste, speziell für die in vivo-Bildgebung kleiner Labortiere entwickelte Geräte verfügbar. Diese zeichnen sich u. a. durch eine im Vergleich zu humanen Geräten höhere räumliche und zeitliche Auflösung sowie spezielle Lagerungsmöglichkeiten für die Tiere aus [13, 34, 35]. Häufig eingesetzte bildgebende Verfahren sind die Micro-Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) und Biolumineszenz (BLI) [9]. Häufig werden die verschiedenen Untersuchungstechniken in Kombination eingesetzt, um von den jeweiligen Vorteilen profitieren und so das bestmögliche Ergebnis erzielen zu können [9, 12].

1.4.1. Mikro-CT

Der Einsatz dieser speziell für die präklinische Forschung und Industrie entwickelten Geräte hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen, was sich im exponentiellen Anstieg akademischer Publikationen niederschlägt (Abbildung. 1, MEDSUM, Micro-CT, 1999-2012).

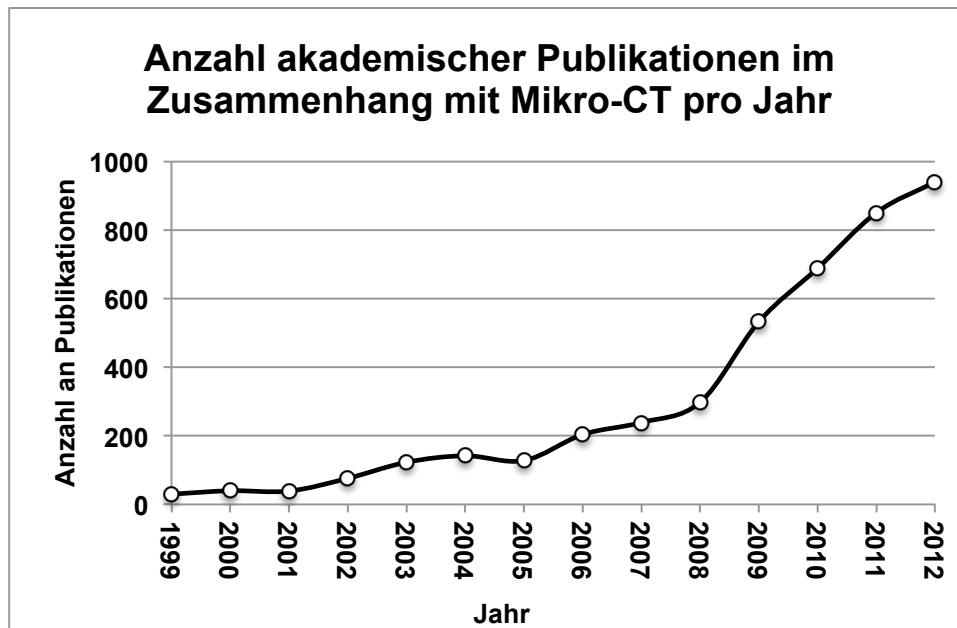


Abbildung 1: Anzahl akademischer Publikationen zum Suchbegriff „Micro-CT“ pro Jahr für den Zeitraum 1999 bis 2012

Erste Mikro-CTs werden seit den 1980er Jahren eingesetzt [35, 36]. Im Vergleich zu den heute verfügbaren Geräten weisen diese noch eine unzureichende räumliche Auflösung, ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Signal-to-Noise-Ratio; SNR) und v. a. sehr lange Untersuchungszeiten auf. Diese sind in Kombination mit einer initial noch hohen Strahlenexposition gerade für in vivo-Studien limitierend. Forscher aus der Physik und Materialwissenschaft können erheblich zur Verbesserung der Bildqualität von Mikro-CTs beitragen. Die Modifizierung des Fächerstrahl-Rekonstruktions-Algorithmus [35, 36] durch Feldkamp und Davis führt zur Kegelstrahl-Geometrie. Dadurch ist es nun erstmals möglich, ein größeres Volumen mit nur einer Rotation (daher wird auch von Volumen-CT oder VCT gesprochen) zu erfassen (und nicht nur eine dünne Schicht wie bei der Fächerstrahl-CT), was zu einer deutlichen Reduktion der Akquisitionszeit führt. Damit wird die Mikro-CT für in vivo-Studien am Tier zunehmend interessant.

Prinzipiell entspricht das Funktionsprinzip der Mikro-CT dem eines klinischen Computertomographen. Dennoch gibt es (je nach Modell) Unterschiede hinsichtlich des Aufbaus und der Anordnung der einzelnen Elemente wie Röntgenröhre, Objekthalterung und Detektor [33, 35, 36]. Mikro-CTs verfügen grundsätzlich über a) eine Röntgenröhre, b) einen Röntgendetektor, welcher die Bildinformationen, die durch Schwächung und Streuung des Primärstrahles/ der Photonen entstehen in elektri-

sche Signale umwandelt, die schließlich digitalisiert werden und c) einer Vorrichtung, die entweder Röntgenröhre und Detektor um das Untersuchungsobjekt rotiert (ein sog. Gantry), oder eine Möglichkeit, das Untersuchungsobjekt im Röntgenstrahl um die eigene Achse zu rotieren [33].

a) Röntgenröhre

In klinischen CTs werden Röntgenstrahlen vorwiegend durch Drehtelleranoden erzeugt. Dabei werden Elektronen von einem erhitzten Wolframdraht erzeugt und in einer Vakuumröhre bis zum Aufprall auf eine rotierende Anode beschleunigt. Die Röntgenstrahlen entstehen durch den Aufprall der Elektronen auf der Anode [37]. Abweichend davon werden in Mikro-CTs meist Transmissionsröntgenröhren verwendet (Abbildung 2). In Transmissionsröhren wird der Elektronenstrahl zusätzlich durch Magnetlinsen vor dem Target zentriert, so dass die Elektronen beim Auftreffen auf das Target einen möglichst kleinen Brennfleck bilden [33]. Treffen die Elektronen auf das Targetmaterial, werden sie abgebremst und erzeugen durch Wechselwirkungsprozesse zum einen Bremsstrahlung und zum anderen charakteristische Strahlung, welche gemeinsam das Spektrum der Röntgenstrahlung ergeben. Im Gegensatz zu Röntgenröhren mit einem Reflektionstarget durchdringt die Röntgenstrahlung das wesentlich dünnere Transmissionstarget vollständig und wird in gleicher Flugrichtung wie die Elektronen emittiert. Dieses Verfahren ermöglicht die Erzeugung eines minimalen Brennflecks [36], wodurch auch bei starker Vergrößerung durch Reduktion des Halbschattenbereichs scharfe Bilder gewährleistet werden [34, 38]. Die Größe des Brennflecks kann bei Multifokus-Transmissionsröntgenröhren durch die angelegte Stromstärke variiert werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei entsprechend kleinen Brennfleckgrößen sich auch nur eine geringe Anzahl an Elektronen im Elektronenstrahl befinden darf, um diesen noch ausreichend durch die Magnetlinsen fokussieren zu können. Die Anzahl der Elektronen wird über den angelegten Röhrenstrom kontrolliert und ist bei kleinen Brennfleckgrößen dementsprechend klein zu wählen, wodurch sich die Leistung der Röhre verringert [39].

Die Strahlenqualität von Röntgenstrahlen besteht unter anderem aus weicher, niederenergetischer Strahlung und harter, höherenergetischer Strahlung. Die Strahlenhärte von Röntgenstrahlen wird durch die angelegte Röhrenspannung beeinflusst. Bei hoher Röhrenspannung überwiegt der Anteil an harter Strahlung, bei niedrigerer Spannung der Anteil an weicher Strahlung. Die harten Strahlenanteile können das

Objekt durchdringen und anschließend den Detektor erreichen. Die weichen Strahlenanteile werden vom Objekt überwiegend gebremst, absorbiert und erhöhen damit die Strahlenbelastung, tragen aber auch zur besseren Detailerkennung von sehr feinen Strukturen und Weichteilgewebe bei. In den Strahlengang eingebrachte Filter (z.B. aus Aluminium, Kupfer, Molybdän) schwächen die Strahlung ab und verändern durch Absorption der weichen Strahlen die Strahlenqualität im Sinne einer Aufhärtung. Dadurch kann die Strahlenbelastung für das Untersuchungsobjekt reduziert werden [40].

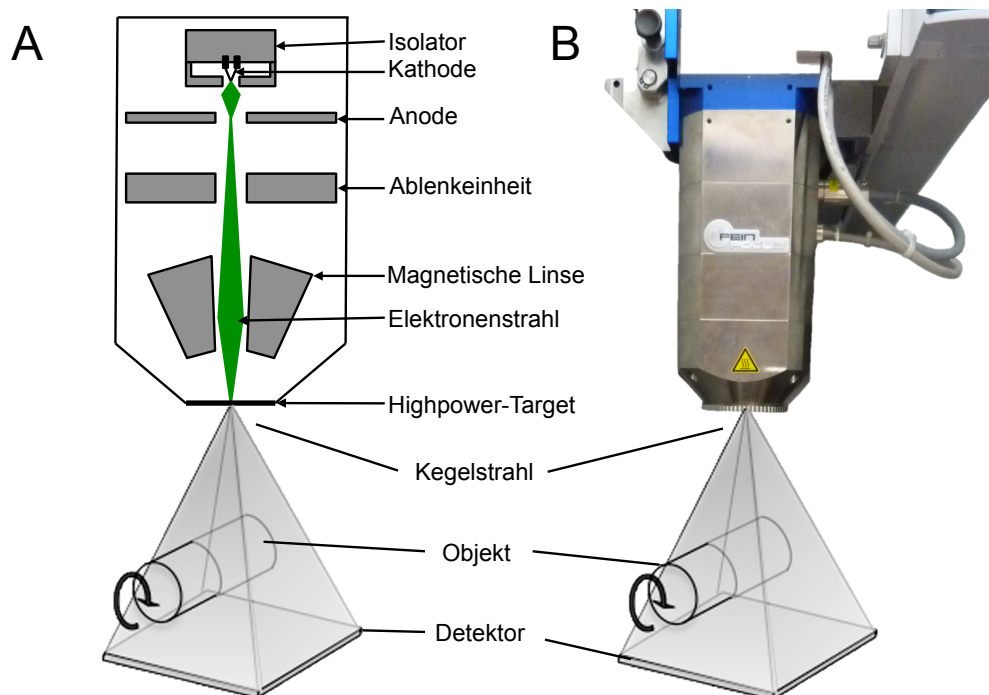


Abbildung 2: Schematisch Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise einer Multifokus-Transmissionsröntgenröhre mit Kegelstrahlgeometrie **(A)**. Photographie der in den Versuchen eingesetzten Transmissionsröntgenröhre **(B)** [41].

b) Detektor

Wie die meisten Volumen-CTs [4, 32] verfügen auch viele Mikro-CTs über einen Flachbilddetektor, der Röntgenbilder in digitaler Form erzeugt. Flachbilddetektoren liefern diagnostische Einzelaufnahmen mit sehr hoher Auflösung, selbst bei großen Untersuchungsobjekten. Darüber hinaus ist es mit Flachbilddetektoren möglich, die Strahlendosis aufgrund der schnelleren Scanprotokolle beträchtlich zu reduzieren [42]. Häufig werden szintillatorkoppelte Detektoren aus amorphem Silicium eingesetzt [43, 44]. Solche Detektoren bestehen im Wesentlichen aus Kristallen und Pho-

todioden. Die einfallende Röntgenstrahlung wird durch den Szintillationskristall zunächst in sichtbares Licht umgewandelt, welches dann zu den darunter liegenden Photodioden weitergeleitet wird. Die Photonen werden in den Photodioden absorbiert und erzeugen dort eine elektrische Ladung, die der Intensität der Röntgenstrahlung proportional ist [38, 45]. Während der Belichtung wird die Ladung in der Photodiode integriert und gespeichert. Der eigentliche Auslesevorgang wird durch den Dünnschichttransistor gestartet, der die Ladung über die Datenleitung zur Ausleseelektronik schaltet. Dort finden eine Verstärkung und die Analog-Digital-Wandlung statt.

c) CT-Rotation

Bei klinischen CTs sind Röntgenquelle und Detektor auf der Gantry montiert, und bewegen sich damit kontinuierlich in einem fest definierten Abstand um den Patienten, während dieser mit einer festgelegten Geschwindigkeit durch den Fächerstrahl gefahren wird (Tischvorschub pro Zeiteinheit, Translation [46]).

Im Gegensatz dazu rotiert bei dem in dieser Arbeit eingesetztem Mikro-CT das Objekt in einem Kegelstrahl um seine eigene horizontale Achse [35, 36]. Durch die Verwendung der Kegelstrahl-Technik während der Bildaufnahme kann das gesamte Untersuchungsobjekt ohne Translation abgebildet werden (Abbildung 3).

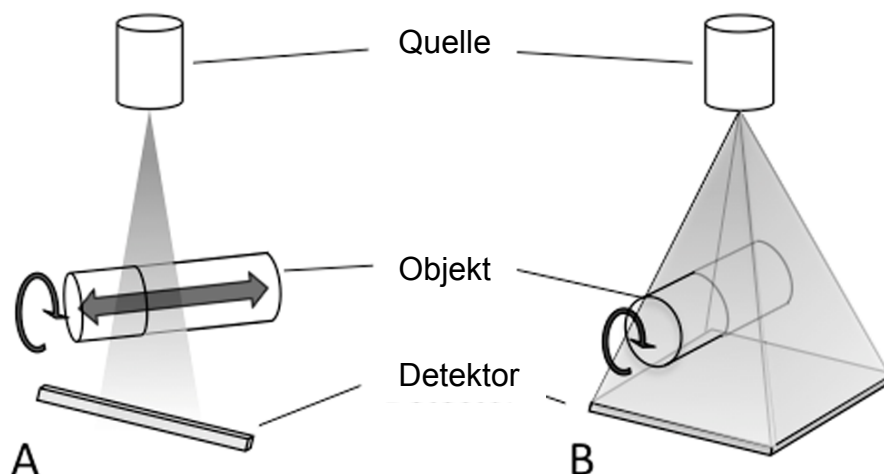


Abbildung 3: Vergleich von Fächerstrahl-CT (A) und Kegelstrahl-/Volumen-CT (B). Bei der Volumen-CT muss im Vergleich zur Fächerstrahl-CT das Objekt nicht entlang seiner horizontalen Achse verschoben werden, da der Kegelstrahl ein größeres Untersuchungsfeld erfasst [41].

1.5. Ziel der vorliegenden Arbeiten

Bisher existierten keine publizierten Arbeiten zur diagnostischen Genauigkeit kontrastmittelgestützter Mikro-CT bei orthotopen Glioblastom-Xenotransplantationen in der lebenden Maus. In ex vivo-Versuchen [47, 48] konnten das dreidimensionale Tumorstadium nicht im longitudinalen Verlauf beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mikro-CT sowohl zur in vivo-Bildgebung von Gehirntumoren vor und nach Therapie im longitudinalen Verlauf in der Maus [49], als auch zur Evaluation der Verteilung von Mikrosphären in einem experimentellen Aneurysmen-Modell [50] eingesetzt.

Alle Experimente wurden mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzkommission (Regierungspräsidium Karlsruhe, Aktenzeichen 35-9185.81/G-230/12; Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW) und gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Publikationen

1.6. Erstautorenschaft

In vivo micro-CT imaging of untreated and irradiated orthotopic glioblastoma xenografts in mice: capabilities, limitations and a comparison with bioluminescence imaging

Stefanie Kirschner¹, Manuela Felix², Linda Hartmann³, Miriam Bierbaum³, Máté E. Maros¹, Hans U. Kerl¹, Frederik Wenz³, Gerhard Glatting², Martin Kramer⁴, Frank A. Giordano^{3*}, Marc A. Brockmann^{5*}

¹ Department of Neuroradiology, University Medical Center Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, 68167 Mannheim, Germany

² Medical Radiation Physics/Radiation Protection, Department of Radiation Oncology, University Medical Center Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, 68167 Mannheim, Germany

³ Department of Radiation Oncology, University Medical Center Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, 68167 Mannheim, Germany

⁴ Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University, 35392 Giessen, Germany

⁵ Clinic of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University Hospital of the RWTH Aachen, 52074 Aachen, German

* both authors contributed equally.

In vivo micro-CT imaging of untreated and irradiated orthotopic glioblastoma-xenografts in mice: capabilities, limitations and a comparison with bioluminescence imaging

Purpose: Small animal imaging is of increasing relevance in biomedical research. Studies systematically assessing the diagnostic accuracy of contrast-enhanced in vivo micro-CT of orthotopic glioma xenografts in mice do not exist.

Methods: NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ mice (n = 27) underwent intracerebral implantation of 2.5×10^6 GFP-Luciferase-transduced U87MG cells. Mice underwent bioluminescence imaging (BLI) to detect tumor growth and afterwards repeated contrast-enhanced (300 μ l iomeprol i.v.) micro-CT imaging (80 kV, 75 μ As, 360° rotation, 1,000 projections, 33 s scan time, resolution 40 x 40 x 53 μ m, 0.5 Gy/scan). Presence of tumors, tumor diameter and tumor volume in micro-CT were rated by two independent readers. Results were compared with histological analyses. Six mice with tumors confirmed by micro-CT received fractionated irradiation (3 x 5 Gy every other day) using the micro-CT (5 mm pencil beam geometry).

Results: Repeated micro-CT scans were tolerated well. Tumor engraftment rate was 74 % (n = 20). In micro-CT, median tumor volume was $30 \pm 33 \text{ mm}^3$, and the smallest detectable tumor measured 360 x 620 μ m. The inter-rater agreement (n = 51 micro-CT scans) for the item tumor yes/no was excellent (Spearman-Rho = 0.862, p < 0.001). Sensitivity and specificity of micro-CT were 0.95 and 0.71, respectively (PPV = 0.91, NPV = 0.83). BLI on day 21 after tumor implantation had a sensitivity and specificity of 0.90 and 1.0, respectively (PPV = 1.0, NPV = 0.5). Maximum tumor diameter and volume in micro-CT and histology correlated excellently (tumor diameter: 0.929, p < 0.001; tumor volume: 0.969, p < 0.001, n = 17). Irradiated animals showed a large central tumor necrosis.

Conclusion: Longitudinal contrast enhanced micro-CT imaging of brain tumor growth in live mice is feasible at high sensitivity levels and with excellent inter-rater agreement and allows visualization of radiation effects.

Keywords: Micro-CT, Bioluminescence, Mouse, Brain, Glioma, In vivo

1.7. Co-Autorenschaft

Feasibility, Safety, and Efficacy of Flow-diverting Stent-assisted Microsphere Embolization of Fusiform and Sidewall Aneurysms

Andrea Nonn¹, **Stefanie Kirschner**², Giovanna Figueiredo¹, Martin Kramer³, Omid Nikoubashman¹, Rastislav Pjontek¹, Martin Wiesmann¹, Marc A. Brockmann^{1, 2}

¹ University Hospital of the RWTH Aachen, Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, Aachen, Germany

² University of Heidelberg, Medical Faculty Mannheim, Department of Neuroradiology, Mannheim, Germany

³ Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Feasibility, Safety, and Efficacy of Flow-Diverting Stent-Assisted Microsphere Embolization of Fusiform and Sidewall Aneurysms

Background: Treatment of wide-necked internal carotid artery aneurysms is frequently associated with incomplete occlusion and high recurrence rates. Furthermore, platinum coils cause strong beam-hardening artifacts, hampering subsequent image analyses.

Objective: To assess the feasibility, safety, and efficacy of flow-diverting, stent-assisted microsphere embolization of fusiform and sidewall aneurysms in vitro and in vivo.

Methods: Using a recirculating pulsatile in vitro flow model, 5 different aneurysm geometries (inner/outer curve, narrow/wide neck, and fusiform) were treated (each $n = 1$) by flow-diverting stent (FDS) implantation and subsequent embolization through a jailed microcatheter using calibrated microspheres (500-900 μm) larger than the pores of the FDS mesh. Treatment effects were analyzed angiographically and by micro computed tomography. The fluid of the in vitro model was filtered to ensure that no microspheres evaded the aneurysm. The experiment was repeated once in vivo.

Results: In vitro, all 5 aneurysms were safely and completely occluded by FDS-assisted microsphere embolization. Virtually complete aneurysm occlusion was confirmed by angiography and micro computed tomography. No microspheres escaped into the circulation. The experiment was successfully repeated in 1 pig with a sidewall aneurysm generated by vessel occlusion. An embolic protection system placed distally of the FDS in vitro and in vivo (each $n = 1$) contained no microspheres after the embolization. Thus, no microspheres were lost in the circulation, and the use of an embolic protection system seems feasible to provide additional safety.

Conclusion: FDS-assisted microsphere embolization of fusiform and sidewall aneurysms is feasible and yields virtually complete aneurysm occlusion while avoiding coil-associated beam-hardening artifacts.

Key Words: Aneurysm, Beads, Embolization, Flow-diverting stent, Microspheres

1.8. Weitere eigene Publikationen

1.8.1. Image-Guided Radiotherapy Using a Modified Industrial Micro-CT for Preclinical Applications

Manuela C. Felix^{1,2}, Jens Fleckenstein², **Stefanie Kirschner**³, Linda Hartmann², Frederik Wenz², Marc A. Brockmann^{3,4}, Gerhard Glatting^{1,2*§}, Frank A. Giordano^{2,§}

¹Medical Radiation Physics/Radiation Protection, Universitätsmedizin Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

²Department of Radiation Oncology, Universitätsmedizin Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

³Department of Neuroradiology, Universitätsmedizin Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

⁴Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University Hospital Aachen, Aachen, Germany

§These authors contributed equally to this work.

Image-Guided Radiotherapy Using a Modified Industrial Micro-CT for Preclinical Applications

Purpose/Objective: Although radiotherapy is a key component of cancer treatment, its implementation into pre-clinical in vivo models with relatively small target volumes is frequently omitted either due to technical complexity or expected side effects hampering long-term observational studies. We here demonstrate how an affordable industrial micro-CT can be converted into a small animal IGRT device at very low costs. We also demonstrate the proof of principle for the case of partial brain irradiation of mice carrying orthotopic glioblastoma implants.

Methods/Materials: A commercially available micro-CT originally designed for non-destructive material analysis was used. It consists of a CNC manipulator, a transmission X-ray tube (10–160 kV) and a flat-panel detector, which was used together with custom-made steel collimators (1–5 mm aperture size). For radiation field characterization, an ionization chamber, water-equivalent slab phantoms and radiochromic films were used. A treatment planning tool was a C++ application. For proof of principle, NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ mice were orthotopically implanted with U87MG high-grade glioma cells and irradiated using the novel setup.

Results: The overall symmetry of the radiation field at 150 kV was 1.04 ± 0.02 %. The flatness was 4.99 ± 0.63 % and the penumbra widths were between 0.14 mm and 0.51 mm. The full width at half maximum (FWHM) ranged from 1.97 to 9.99 mm depending on the collimator aperture size. The dose depth curve along the central axis followed a typical shape of keV photons. Dose rates measured were 10.7 mGy/s in 1 mm and 7.6 mGy/s in 5 mm depth (5 mm collimator aperture size). Treatment of mice with a single dose of 10 Gy was tolerated well and resulted in central tumor necrosis consistent with therapeutic efficacy.

Conclusion: A conventional industrial micro-CT can be easily modified to allow effective small animal IGRT even of critical target volumes such as the brain.

1.8.2. Minimally invasive monitoring of chronic central venous catheter patency in mice using digital subtraction angiography (DSA)

Giovanna Figueiredo^{1,2}, Teresa Fiebig², **Stefanie Kirschner**², Omid Nikoubashman¹, Lisa Kabelitz¹, Ahmed Othman¹, Andrea Nonn¹, Martin Kramer³, Marc A. Brockmann^{1,2*}

¹ Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University Hospital of the RWTH Aachen, Aachen, Germany

² Department of Neuroradiology, University Medical Center Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

³ Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Minimally invasive monitoring of chronic central venous catheter patency in mice using digital subtraction angiography (DSA)

Background: Repetitive administration of medication or contrast agents is frequently performed in mice. The introduction of vascular access mini-ports (VAMP) for mice allows long-term vascular catheterization, hereby eliminating the need for repeated vessel puncture. With catheter occlusion being the most commonly reported complication of chronic jugular vein catheterization, we tested whether digital subtraction angiography (DSA) can be utilized to evaluate VAMP patency in mice.

Methods: Twenty-three mice underwent catheterization of the jugular vein and subcutaneous implantation of a VAMP. The VAMP was flushed every second day with 50 μ L of heparinized saline solution (25 IU/ml). DSA was performed during injection of 100 μ L of an iodine based contrast agent using an industrial X-ray inspection system intraoperatively, as well as 7 ± 2 and 14 ± 2 days post implantation.

Results: DSA allowed localization of catheter tip position, to rule out dislocation, kinking or occlusion of a microcatheter, and to evaluate parent vessel patency. In addition, we observed different ante- and retrograde collateral flow patterns in case of jugular vein occlusion. More exactly, 30 % of animals showed parent vessel occlusion after 7 ± 2 days in our setting. At this time point, nevertheless, all VAMPs verified intravascular contrast administration. After 14 ± 2 days, intravascular contrast injection was verified in 70 % of the implanted VAMPs, whereas at this point of time 5 animals had died or were sacrificed and in 2 mice parent vessel occlusion hampered intravascular contrast injection. Notably, no occlusion of the catheter itself was observed.

Conclusion: From our observations we conclude DSA to be a fast and valuable minimally invasive tool for investigation of catheter and parent vessel patency and for anatomical studies of collateral blood flow in animals as small as mice.

1.8.3. The infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1:

Development, blood supply and infundibular cementogenesis

A. Suske¹, A. Pöschke¹, P. Schrock², **S. Kirschner**³, M. Brockmann³, C. Staszky^{1,*}

¹Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 98, IN 35390 Giessen Germany

²Institute of Anatomy, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, IN 30173 Hannover, Germany

³Department of Neuroradiology, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, IN 68167 Mannheim, Germany.

The infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1: Development, blood supply and infundibular cementogenesis

There is increasing interest in diseases of infundibula of equine maxillary cheek teeth. An imperfect infundibular cementogenesis has been recognized as an aetiopathological factor for the onset of infundibular necrosis. Therefore, infundibular development has been examined with particular attention given to infundibular blood vessels and cementogenesis.

Forty one deciduous maxillary premolars were investigated prior to eruption. Teeth were examined using routine histological and immunohistological methods visualizing blood vessels and the enamel organ. Selected specimens were scanned by micro computed tomography (μ CT) to analyse the three-dimensional configuration of the developing infundibulum.

Prior to eruption the infundibula are reached by a central infundibular artery entering the infundibulum from an occlusal direction and sideward arteries entering the mesial infundibulum from the mesial aspect and the distal infundibulum from the distal aspect. The central infundibular artery becomes destroyed shortly after tooth eruption however the sidewise arteries remain vital for a certain period of time after eruption. As the sidewise arteries of the distal infundibulum are located in a more apical position compared to those of the mesial infundibulum, the distal infundibulum receives blood for a longer period of time than the mesial infundibulum. Cementogenesis starts first at distinct enamel infoldings in the occlusal part of the infundibula advancing in apical direction. These results suggest a distinct asymmetry between the infundibula with the mesial infundibulum being prone to incomplete cementogenesis due to early blood supply cessation.

Übergreifende Diskussion

Die präklinische Forschung ist sowohl für die Human-, als auch für die Tiermedizin von hoher Relevanz. Ziel der Grundlagenforschung ist die Gewinnung neuer Erkenntnisse, welche die Basis für den späteren klinischen Einsatz bilden. Darüber hinaus lassen sich die Entstehung von Krankheiten und deren Heilungsprozesse erforschen, ohne dabei Patienten zu gefährden [3]. Derzeit können viele Erkrankungen aufgrund der Komplexität des menschlichen bzw. tierischen Organismus nicht ausschließlich *in vitro* erforscht werden. Experimente mit Zellkulturen zur Entwicklung neuer Medikamente sind i.d.R. der erste Schritt zur Identifizierung neuer Therapieziele oder zur Untersuchung neuer Medikamente [6]. Klinische Studien belegen jedoch, dass *in vitro* Experimente oft falsch-positive Ergebnisse erbringen, da diese nicht in der natürlichen Umgebung eines Tumors durchgeführt werden [6, 15]. Tumorzelllinien, die über mehrere Jahre kultiviert wurden, unterscheiden sich immer von ihrem Ursprungstumor. Tumor-Matrix-Interaktionen können teilweise nachgeahmt werden, indem Zellkulturen mit Matrixproteinen und dreidimensionalen Zellstruktursystemen versorgt werden [6]. Dennoch kann die gesamte Bandbreite an komplexen Tumor-Stroma-Interaktionen, charakterisiert durch eine Kombination aus Matrixproteinen, Serum, Wachstumsfaktoren, Hormonen und anderen Substanzen, nicht imitiert werden [6]. Gleichmaßen sind einige Prozesse wie Tumorangiogenese, Invasion und Metastasierung von Tumor-Wirt-Interaktionen abhängig und essentiell für Tumorentwicklung, Phänotyp, Wachstumsverlauf und Versorgung [6]. Diese Prozesse können bisher noch nicht *in vitro* nachgebildet werden. *In vivo*-Modelle stellen die genannten essentiellen Tumor-Wirt-Interaktionen bereit und ermöglichen dadurch einen naturgetreueren Versuchsablauf [6]. Allerdings bestehen bei *in vivo*-Experimenten auch bestimmte Probleme und Einschränkungen, welche weiter unten beschrieben werden [15].

Dennoch sind Tierversuche in den Naturwissenschaften nach wie vor essentiell. Um ein hohes Maß an Tierwohl für die Versuchstiere sicherzustellen, werden diese in den entsprechenden Einrichtungen u.a. veterinärmedizinisch betreut. Obwohl Tierversuche in vielen Bereichen der Wissenschaft unverzichtbar sind, sollten aus ethischen und moralischen Gründen stets neue Lösungsansätze und Strategien entwickelt werden, um die Anzahl der für einen Versuch verwendeten Tiere möglichst gering zu halten. Zwar wurden für beide in dieser Arbeit vorgestellten Projekte Tierversuche

suche durchgeführt (Maus-Gliom-Modell, Schwein-Aneurysma-Modell), gleichzeitig konnten wir aber durch die Etablierung neuer Methoden zur Reduzierung der Versuchstierzahlen beitragen. Die Experimente wurden mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzkommission (Regierungspräsidium Karlsruhe, Aktenzeichen 35-9185.81/G-230/12; Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW) und gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Eine Möglichkeit zur Reduktion der Versuchstierzahl besteht im Einsatz verschiedener Bildgebungsmodalitäten, wie z.B. einem Mikro-CT [9]. Bevor hochauflösende Geräte zur in vivo Bildgebung verfügbar waren, war die Erforschung verschiedener Krankheiten in Kleintiermodellen auf ex vivo-Untersuchungen beschränkt. Für longitudinale Studien war entweder die Entnahme einer Biopsie nötig, oder größere Gruppen von Versuchstieren mussten zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet werden, um verschiedene Stadien der Erkrankung untersuchen zu können und statistisch signifikante Resultate zu erlangen [32]. Auch im Zusammenhang mit der Studie zu Aneurysmen wurden zur Etablierung der Methode zunächst Vorversuche mit einem Schlauchmodell durchgeführt, das den Blutkreislauf im lebenden Organismus simuliert. Die Erfolgskontrolle der Embolisation von Aneurysmen erfolgte u. a. in unserem Mikro-CT. Erst nach erfolgreichen in vitro-Versuchen wurden die bisher gewonnen Erkenntnisse aus den Modell-Versuchen am Versuchstier (Schwein) angewendet.

In der von uns publizierte Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass die Kleintier-CT für die Bildgebung von orthotop wachsenden Hirntumoren im Mausmodell geeignet ist [49]. Die Erforschung der Pathophysiologie des Glioblastoms zur Entwicklung neuer Therapieansätze ist aufgrund der bisher infausten Prognose dieser Erkrankung von hoher Relevanz [28-30, 51]. Einer aktuellen deutschen Statistik zufolge wurde die Diagnose eines bösartigen primären Hirntumors im Jahr 2010 insgesamt bei 6 920 Menschen gestellt [52]. Damit kommen Gliome zwar selten vor (zum Vergleich: 2010 erkrankten in Deutschland 70 340 Frauen an Brustkrebs und 17 466 starben daran (Zentrum für Krebsregisterdaten; ZfKD)), dennoch haben sie aufgrund ihres dramatischen Krankheitsverlaufes eine große Bedeutung in der Medizin.

Mausmodelle sind mittlerweile fest etablierter Bestandteil der Glioblastomforschung [15, 53, 54]. Der Erkenntnisgewinn aus diesen Studien kann auch von veterinärmedizinischer Relevanz sein, da auch Kleintiere wie Hunde und Katzen an Gehirntumoren

erkranken [55-58]. Für Tiere existiert noch kein einheitliches Therapieprotokoll zur Behandlung von intrakraniellen Neoplasien [59, 60], jedoch basieren die aktuellen Therapieansätze auf bisherigen humanmedizinischen Forschungsergebnissen [61]. Gerade bei Tieren stellt die Behandlung aufgrund verschiedener Abbruchkriterien aus tierschutzrechtlichen Gründen eine große Herausforderung dar. So kann die Veterinärmedizin von neuen Therapieansätzen profitieren, die unter Umständen schonender und effektiver in ihrer Wirkung sind. Auch im Hinblick auf die bildgebende Diagnostik gibt es Parallelen zwischen Mensch und Tier. Von vergleichbaren Charakteristika caniner und humaner Gehirntumoren sowohl in der CT, als auch in der MRT wurde bereits berichtet [62, 63].

Obwohl sich, wie bereits erwähnt, verschiedene Nager-Modelle seit über 30 Jahren in präklinischen Studien von Gehirntumoren bewährt haben, wird ihr Einsatz kontrovers diskutiert [64]. Kritisiert wird, dass wichtige pathologische Merkmale des humanen GBM wie z.B. das invasive Wachstum in Xenograft-Modellen abweichen. Ein geeignetes Hirntumor-Modell sollte die gleichen genetischen Faktoren, anatomische Lokalisation, histopathologischen Merkmale und Zeitrahmen der Tumorentwicklung wie der Tumor im Menschen aufweisen [16]. Zu den am weitesten verbreiteten Modellen gehören Xenotransplantations-Modelle, Modelle mit genetisch veränderten Mäusen (genetically engineered mouse models, GEMMs) und durch karzinogene induzierte Hirntumoren (v. a. mit Ratten) [15, 16]. So konnten beispielsweise in Ratten erfolgreich Gliome durch die Injektion von karzinogenen alkalischen Substanzen wie N-Methyl-nitrosoharnstoff (MNU, methyl nitroso urea) oder N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU, ethyl nitroso urea) erzeugt werden [16]. Jedoch zeigen diese Tumoren häufig ebenfalls ein scharf abgrenzbares Wachstum, was dem normalerweise invasiven Phänotyp eines Glioblastoms widerspricht [16]. Es wird tierexperimentell versucht, dieses Problem z. B. durch Entwicklung orthotoper, syngener Tumormodelle zu umgehen. Ziel ist es, einen aggressiven Abkömmling von murinen Tumorzellen nach Inokulation und mehrmaliger Passagierung in der Maus zu generieren. Durch die Entwicklung verbesserter Kulturbedingungen können dreidimensionale, frei schwimmende Zellaggregate, sog. Sphären, kultiviert werden [15]. Die Vorteile der Sphärenbildung gegenüber einschichtigen (sog. Monolayer-) Kulturen liegen zum einen darin, dass die Glioblastom-Sphären besser den molekularen Aufbau des Ursprungstumors widerspiegeln und das molekulare Profil des Tumors im zeitlichen Verlauf stabiler ist. Zum anderen sind Sphären äußerst tumorigen, zeigen in vivo einen variablen Um-

fang an Angiogenese sowie ein invasives Wachstum, was für Glioblastome typisch ist [15]. Nachteilig ist es, dass sich Tumorsphären nicht aus allen humanen Glioblastomzelllinien erfolgreich kultivieren lassen. Die Erfolgsrate variiert sehr stark in den verschiedenen Laboratorien und reicht von Angaben mit 10–20 % bis zu 100 % [15].

Invasive, intrakranielle Tumoren können auch über eine Heterotop-zu-Orthotop-Methode erzeugt werden [15]. Hierbei wird eine in der Biopsie gewonnene Gewebeprobe des menschlichen Tumors direkt in die Flanke (seitliche Bauchregion) einer immundefizienten Maus transplantiert. Solche Xenografts können problemlos mehrmals in der Maus passagiert werden (sog. Subkultivierung). Werden diese Zellen dann intrakraniell implantiert entstehen Tumore, die eine große Ähnlichkeit zu den entsprechenden humanen Tumoren aufweisen [15].

In vivo Xenotransplantations-Modelle beruhen auf einer Implantation oder Injektion von primären Tumorzellen oder Zelllinien subkutan oder orthotop in immunsupprimierte Mäuse oder immunologisch naive Neugeborene [6, 15, 16]. Bei Xenotransplantations-Modellen wird der Tumor entweder durch die direkte Transplantation von Biopsiematerial in das Tier oder durch die Injektion kultivierter Zellen eines humanen Tumors erzeugt [6]. Generell führt die Inokulation von humanen Glioblastomzellen in immundefiziente Tiere zur Entwicklung eines Tumors mit den typischen Wachstumscharakteristika. Dazu gehören die Synchronität und Reproduzierbarkeit der Tumorentstehung sowie expansives, invasives und perivaskuläres Wachstum des Tumors [6, 15]. Allerdings wird die Invasion einzelner Zellen in das umliegende Gewebe nur selten beobachtet [6, 15, 16]. Zellen zur Implantation werden unter Kultur- oder Isolationsbedingungen häufig verändert und ihnen fehlt ihr natives Stroma wie Bindegewebe und nutritive Blutgefäße [6, 15]. Daraus resultiert, dass Tumoren aus Xenotransplantationsmodellen häufig sehr scharf begrenzt wachsen und selten das Erscheinungsbild des Ursprungstumors aufweisen [6]. Die Vorteile auf humanen Zelllinien basierten Modellen liegen in der guten Reproduzierbarkeit im Hinblick auf die Tumorangehrate sowie des kalkulierbaren Wachstums und Krankheitsverlaufs [6].

Eine Einschränkung des Xenotransplantations-Modells liegt in der Notwendigkeit der Injektion einer hohen Zellzahl in den Wirtskörper [16]. Dies entspricht nicht der Entstehung eines Tumors im Menschen. Hinzu kommt, dass durch die Verwendung immundefizienter Tiere die Beteiligung des Immunsystems an der Tumorentstehung

nicht berücksichtigt wird [14, 16]. Immunsupprimierte und immundefiziente Mäuse zeigen keine anti-Tumor-Effektmechanismen und können während Arzneimittelversuchen zu falsch positiven Ergebnissen führen [6]. Xenotransplantations-Tumor-Modelle fassen nicht verlässlich die Ätiologie, Pathophysiologie und Biochemie des humanen Ursprungstumors zusammen, was das Erkennen von Therapieeffekten und die Abgrenzung dieser von experimentell induzierten Artefakten erschwert [6]. Darüber hinaus limitiert der Einsatz immundefizienter Tiere experimentelle Strategien zur Immuntherapie in Xenograft-Modellen [6]. Dennoch ist die Implantation von humanen Glioblastomzellen in immundefiziente Labornager am weitesten verbreitet [6]. Idealerweise sollten präklinische Tumor-Modelle im Tier also relevante Eigenschaften der humanen Erkrankung simulieren (z. B. invasives Wachstum), aber gleichzeitig auch eine hohe Ähnlichkeit zu humanen Glioblastomzellen auf zellulärer Ebene bieten, was bisher nicht suffizient gelöst werden konnte. Die Mehrheit der charakteristischen genetischen Veränderungen von humanen Gehirntumoren treten in Genen auf, welche für Proteine kodieren, die an der Signaltransduktion oder der Zellzyklusregulation beteiligt sind [6]. Bei Gehirntumor-Modellen mit genetisch veränderten Mäusen (GEMMs) werden bestimmte Genveränderungen, die in humanen Tumoren identifiziert wurden (mit Effekt auf spezifische Onkogene oder Tumor-suppressor-Gene) in die tierische Keimbahn eingeschleust (knock-out, knock-in, transgene Modelle), um eine de novo-Tumorentstehung zu erreichen [6]. Der so entstandene Tumor ähnelt sowohl in der Ätiologie, als auch in der Histopathologie und Biologie einem Tumor des Menschen. Obwohl diese Modelle den Prozess der Tumorentstehung im Vergleich zu anderen Modellen besser nachahmen, kann die Entfernung eines Tumorsuppressor-Gens aus dem Gesamtorganismus zu verschiedenen Krankheiten, Krebs inbegriffen, führen, was die genaue Analyse der Auswirkungen auf die Gehirntumorentwicklung ausschließt. Bei Gehirntumor-Modellen ist der Einsatz von Tieren mit spontaner Tumorentwicklung aufgrund der mangelhaften Reproduzier- und Vergleichbarkeit komplizierter. Ein Vorteil von GEMMs ist, dass eine bekannte genetische Veränderung genutzt wird, um eine Tumorentstehung de novo in einem immunkompetenten Wirtsorganismus zu erzeugen. Dadurch kann der gesamte tumorerzeugende Prozess, von der Transformation der Ursprungszellen bis zum voll entwickelten Tumor, in einem geeigneten Mikromilieu untersucht werden [14, 16]. Diese Anforderungen werden z. B. von Haushunden oder Katzen erfüllt, welche spontan Glioblastome entwickeln [15, 65]. Dabei erkrankten Hunde häufiger als Katzen an

einem Gehirntumor [55]. Intrakranielle spontane primäre Gehirntumoren kommen beim Hund 3x häufiger vor als beim Menschen. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer intrakraniellen Neoplasie haben v.a. Boxer, Golden Retriever, Doberman Pinscher, Scottish Terrier und Old English Sheepdogs. Besonders brachyzephe Rassen haben eine Prädisposition ein GBM zu entwickeln [57, 62]. Laut verschiedener Studien sind Meningeome die häufigsten intrazerebralen Tumore bei Kleintieren, gefolgt von Astrozytomen [56, 58].

Die Möglichkeit Krebserkrankungen an Hunden zu studieren wurde schon in den frühen 60er Jahren in Betracht gezogen [61]. Der seit langem bestehende Einsatz von Hunden in der biomedizinischen Forschung, ihre großen anatomischen und physiologischen Übereinstimmung mit dem Menschen und die hohe Anzahl an Krebs-Neuerkrankungen (>1 000 000/Jahr in den USA) haben das Interesse am Haushund als Versuchs-Modell verstärkt [61]. Kanine GBMs sind hochinvasiv und weisen ein dem humanen GBM vergleichbar invasives Wachstumsmuster [57] weit über die Grenzen der in der Bildgebung kontrastmittelaufnehmende Tumoranteile hinaus auf. Daher eignen sich Hunde mit spontanen GBMs auch zur Untersuchung des invasiven Wachstums von Hirntumoren. Das invasive Wachstum macht aber auch eine komplette Resektion der Tumoren unmöglich. Darüber hinaus lässt sich die Erkrankung beim Hund, im Vergleich zum Nager, über einen längeren Zeitraum therapieren und beobachten. Hinzu kommt, dass durch die Erkrankung verschiedener Rassen eine genetische Vielfaltigkeit ähnlich derer in der menschlichen Population gegeben ist, was beim Einsatz eines Inzuchtstammes von Labornagern nicht der Fall ist [61, 66]. Ein Nachteil liegt in der geringen Verfügbarkeit von an einem Glioblastom erkrankten Hunden. Diese Tiere werden in den einzelnen Tierkliniken nur gelegentlich vorgestellt. Eine Studie mit großen Tierzahlen wäre nur in Zusammenarbeit mit mehreren Kliniken eventuell möglich, dies ist jedoch aus logistischen Gründen und der immer noch insgesamt geringen Tierzahl schwierig umsetzbar. Verdächtige Tiere müssten zunächst vom Haustierarzt an eine entsprechende Einrichtung überwiesen werden, die über sämtliche Möglichkeiten der modernen Diagnostik und Therapie verfügt (CT, MRT, chirurgische Resektion, Strahlentherapie, Chemotherapie). Weiterhin muss der Besitzer der Studie zustimmen, was für ihn mit einer v. a. hohen emotionalen Belastung einhergehen kann. Im Vergleich dazu sind Labortiere wesentlich leichter verfügbar. Erste Tumoren können teilweise schon 14 Tage nach Xenotransplantation diagnostiziert werden. Daher können Studien in relativ kurzer Zeit

durchgeführt werden. Außerdem kann bei diesen Tieren simultan ab Tumordetektion mit der Therapie begonnen werden, was für die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse bedeutend ist. Vergleichend werden Hunde von ihren Besitzern zu ganz unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung vorgestellt. Dies erfordert die Einteilung der erkrankten Tiere in verschiedene Gruppen nach Krankheitsstadium zur Evaluation der Versuchsergebnisse.

Daher spielen In der Veterinärmedizin Glioblastome und deren Therapie eine bisher eher untergeordnete Rolle. Folglich gibt es bisher kaum Daten bezüglich des Einflusses verschiedener Therapiemodalitäten auf die Überlebenszeit und die klinische Relevanz bei an einem Glioblastom erkrankten Tieren [57]. Die bisherigen Studien befassen sich allgemein mit der Therapie caniner Gehirntumoren [56, 59, 60, 65, 67-69]. Zum anderen ist eine Therapie je nach Ausmaß der Erkrankung nicht mehr vertretbar, denn gerade die Tumoresektion kann zu erheblichen irreversiblen neurologischen Schäden führen, die mit dem Leben des Tieres nicht mehr zu vereinbaren sind. Der hohe therapeutische Aufwand und die damit verbundenen Kosten sind für den Tierhalter häufig nicht zu bewältigen. Weiterhin muss unter Umständen auch aus tierschutzrelevanten Gründen die Therapie abgebrochen werden, da entstandene Schmerzen und Leiden für das Tier nicht mehr mit der ohnehin fraglichen Prognose zu vereinbaren sind. Demnach beschränkt sich die Therapie zumeist auf die Reduktion der klinischen Symptome, um die Lebensqualität der Tiere zu verbessern und ihre Lebenserwartung zu verlängern [70]. Dennoch berichten einige Forschungsgruppen von Therapieversuchen bei verschiedenen Hirntumoren mit unterschiedlichen Bestrahlungsprotokollen, v. a. bei Hunden und teilweise auch bei Katzen [58, 59, 67], die das Überleben der Tiere teilweise signifikant verlängerten. In einer Studie von Evans et al. (1993) wurden n=14 Hunde mit Strahlentherapie behandelt. Neun Hunde erhielten eine Gesamtdosis von 39 Gray, fünf Hunde eine Gesamtdosis von 45 Gray. Bei beiden Gruppen wurde die Gesamtdosis über 12 Fraktionen verabreicht. Die durchschnittliche Überlebenszeit lag bei 345 Tagen. Die Ergebnisse wurden von Evans et al. mit der durchschnittlichen Überlebenszeit von 30-81 Tagen bei symptomatisch bzw. unbehandelten Hunden (n=8) aus einer weiteren Studie verglichen [71] und führten zu der Annahme, dass eine Bestrahlungstherapie die Überlebenszeit von an einem Gehirntumor erkrankten Hund verlängert. Bearley et al. (1999) hingegen untersuchte n=83 Hunde, die er je nach Tumorlokalisation in drei verschiedene Gruppen einteilte. Demnach hatten 41 Hunde einen extra-axialen Tu-

mor (außerhalb des Gehirnparenchyms, v.a. Meningeome), 34 Hunde einen intra-axialen Tumor (im Gehirnparenchym, v.a. gliale Tumore) und 8 Hunde einen hypophysären Tumor, v.a. Makroadenome). Alle Tiere wurden mit einer Gesamtdosis von 38 Gray mit einem Dosisescalationsschema (5, 7, 8, 9 und 9 Gray) bestrahlt. In die Überlebensstatistik wurden 66 der 83 Tiere mit einbezogen. Die mediane Überlebenszeit betrug für alle Tiere 43,7 Wochen (extra-axiale Tumore: 49,7 Wochen; intra-axiale Tumore: 40,4 Wochen; hypophysäre Tumore: 21,0 Wochen). Bearley et al. verglich seine Daten mit einer Studie von Heidner et al. (1991) [58], in der Tiere ohne (n=7) bzw. mit symptomatischer Therapie (n=38) nur 0,2 Monate überlebten.

Mittlerweile verfügen immer mehr Einrichtungen über moderne, speziell für Haustiere entwickelte Linearbeschleuniger, die eine punktgenaue Bestrahlung von Tumoren ermöglichen. Eine fraktionierte Radiotherapie von Gehirntumoren als alleinige oder adjuvante Therapie zur chirurgischen Tumorentfernung wirkt sich begünstigend auf die Behandlung dieser Erkrankung aus. Die alleinige Gabe von systemisch wirkenden Chemotherapeutika ist meistens nicht ausreichend zur effektiven Therapie eines Gehirntumors [65]. Da ein optimales Bestrahlungsprotokoll für Tiere in den bislang durchgeführten Studien [59, 60] noch nicht ermittelt werden konnte, besteht gerade im Bereich der Bestrahlung von Gehirntumoren Forschungsbedarf.

Ziel der Strahlentherapie ist es, möglichst viele Tumorzellen zu töten, ohne dabei die für den Patienten nachteiligen Effekte der Bestrahlung zu erhöhen. Akute Nebenwirkungen durch Bestrahlung sind häufig und bei klinisch relevanten Dosen zu erwarten. Am häufigsten treten gegen Ende der Therapie Mukositiden, epidermale Entzündungen und Keratitiden in Abhängigkeit des Bestrahlungsfeldes auf [68]. Das Auftreten akuter Nebenwirkungen kann in Kauf genommen werden, da sie i.d.R. schnell und vollständig ausheilen. Im Vergleich zu den akuten Nebenwirkungen, treten späte Auswirkungen der Bestrahlungstherapie erst Monate bis Jahre nach Behandlung auf und sind irreversibel. Zu ihnen gehören Nekrose, Fibrose, nicht heilende Ulzerationen, Schäden des ZNS und Erblindung [68]. Das Auftreten von späten Nebenwirkungen ist abhängig von der Größe der Dosis der jeweiligen Bestrahlungsfraktion und weniger von der Gesamtdosis der Therapie [68]. Die späten Nebenwirkungen durch Bestrahlung gelten als Dosis-limitierend und das Bestrahlungsprotokoll sollte so gewählt werden, dass sie möglichst vermieden werden können. Auf der an-

deren Seite sind diese spät auftretenden Nebeneffekt in Abhängigkeit von der Prognose des behandelten Hirntumors zu vernachlässigen [68].

In der Humanmedizin können mit aggressiver Therapie, je nach Tumor, hohe Heilungsraten erzielt werden [72-74]. Aufgrund der auch bei älteren humanen Patienten hohen Lebenserwartung können Effekte, die erst nach fünf Jahre gesehen werden, immer noch zu einer erheblichen Morbidität führen [75]. Bei den veterinärmedizinischen Patienten ist die Lebenserwartung deutlich geringer und besonders bei älteren Tieren ist, auch wenn diese geheilt werden konnten, die Überlebenszeit nicht ausreichend um späte Nebenwirkungen durch eine Strahlentherapie zu sehen.

In der Tiermedizin findet die Strahlentherapie daher meist postoperativ zur Behandlung residueller Tumoranteile Anwendung. Die Tumorkontrollrate ist abhängig von der Gesamtdosis, der Dosis pro Fraktion und der Protrahierung der Bestrahlungsbehandlung. In den bislang durchgeführten Studien konnte eine optimale Dosis zur Bestrahlung noch nicht ermittelt werden. Meistens handelt es sich in den Studien um heterogene Tumoren, deren Prognose per se sehr unterschiedlich sein kann [58-60, 67]. Die Therapieansätze in der Veterinärmedizin basieren i. d. R. auf den sich bereits in der Humanmedizin bewährten Behandlungsprotokollen in der Tumorthherapie[3]. Die Übertragung dieser Protokolle ist normalerweise ohne Komplikationen möglich, da die in der Humanmedizin angewendeten Therapieverfahren mit Hilfe von Tierversuchen erarbeitet wurden [3]. Somit können Untersuchungsergebnisse aus der präklinischen Forschung an Mäusen nicht nur im Bereich der Humanmedizin zu neuen Therapieansätzen führen, sondern gerade Haustiere wie Hunde und Katzen könnten von neuen Forschungsergebnissen profitieren.

Neben der beschriebenen Studie zur Bildgebung von Glioblastomen in der Maus lässt sich die Mikro-CT auch zur Bearbeitung einer Vielzahl weiterer Fragestellungen einsetzen. Dazu gehört z.B. die Darstellung thorakaler und abdomineller Strukturen [4, 5] sowie kleinster zerebraler Blutgefäße bei der Maus [76, 77], aber auch die Anwendung der Mikro-CT in der zahnmedizinischen Forschung [78], zur Erforschung von Insekten für biomechanische Fragestellungen [79, 80]. Dementsprechend befasst sich die zweite im Rahmen dieser kumulativen Dissertation eingereichten Arbeit mit der Evaluation des Embolisierungsergebnisses von Aneurysmen mittels einer neuen Technik.

Bei Aneurysmen handelt es sich um Gefäßaussackungen, die überwiegend an der Aufzweigung von arteriellen Blutgefäßen aufgrund einer Schwächung in der Gefäßwand auftreten [18, 81-83]. Dabei lassen sich sackförmige (sakkuläre), welche die häufigste Form darstellen, von unregelmäßigen oder auch fusiformen Aneurysmen unterscheiden [84, 85]. Die Schwächung der Gefäßwand im Bereich des Aneurysmas erhöht das Risiko für eine Aneurysmaruptur mit anschließender Blutung in das umliegende Gewebe [18]. Rupturieren intrakranielle (intradural gelegene) Aneurysmen, kommt es in der Regel zu einer Blutung in den sogenannten Subarachnoidalraum, welcher das „Hirnwasser“ (also den Liquor) beinhaltet. Die Folgen einer solchen Subarachnoidalblutung (SAB) sind oft schwerwiegend und reichen nicht selten bis zum Tod. Ursächlich hierfür sind unter anderem ein akuter intrakranieller Druckanstieg durch die Blutung, sowie die nach einer Latenz von einigen Tagen auftretenden zerebralen Vasospasmen, welche oft zu zerebralen Ischämien führen [82, 83]. Ziel der Behandlung von Aneurysmen ist daher der komplette, sofortige und dauerhafte Verschluss der Aneurysmen [86]. Um dieses Ziel zu erreichen wurde eine neue Technik etabliert, bei welcher das Aneurysma mit einem mit sehr engen Maschen gewobenen Stent überdeckt wird. Auch im Zusammenhang mit der Studie zu Aneurysmen wurden zur Etablierung der Methode zunächst Vorversuche mit einem Schlauchmodell durchgeführt, das den Blutkreislauf im lebenden Organismus simuliert. Die Erfolgskontrolle der Embolisation von Aneurysmen erfolgte u. a. in unserem Mikro-CT. Erst nach erfolgreichen in vitro-Versuchen wurden die bisher gewonnen Erkenntnisse aus den Modell-Versuchen am Versuchstier (Schwein, n=1) angewendet. Über einen zuvor im Aneurysma platzierten Mikrokatheter wurde das Aneurysma mit Mikropartikeln embolisiert, welche größer als die Maschen des flussmodulierenden Stents (sog. flow diverter) sind. Mittels Mikro-CT konnten wir die 700–900 µm kleinen Partikel im Aneurysma nachweisen und eine komplette Embolisation des Aneurysmas verifizieren [50].

Während in der Humanmedizin Aneurysmen in den Neurodisziplinen zwar nicht zahlenmäßig, aber aufgrund der Schwere der Erkrankung eine relevante Rolle spielen [82, 83, 86] spielen Aneurysmen in der Tiermedizin nur eine marginale Rolle [87]. Gelegentlich sind Pferde, v.a. ältere Hengste und Hochleistungspferde, von Aortenaneurysmen (Sinus Valsalva Aneurysma) betroffen [88, 89]. Die Tiere werden i. d. R. erst nach Ruptur des Aneurysmas aufgrund der schwerwiegenden Symptomatik auffällig. Da die Prognose nach Diagnosestellung ungünstig bis infaust ist, werden Aor-

tenrupturen beim Tier nicht therapiert. Des Weiteren wird sowohl bei Pferden [90, 91] als auch bei Hunden [92] von parasitär bedingten Aneurysmen berichtet. Bei Rindern wird gelegentlich von Aneurysmen der A. mesenterica cranialis berichtet [93, 94]. Für zerebrale Aneurysmen existieren bei Tieren einzelne Fallberichte, [87, 95, 96] insgesamt bleiben diese jedoch (z.B. auch im Vergleich zu den Hirntumoren beim Hund) eine Seltenheit. Dennoch spielen Tiere eine wichtige Rolle bei der Erforschung von Pathogenese und Hämodynamik sowie neuer Therapiemöglichkeiten von Aneurysmen, weshalb in der zweiten hier angeführten Publikation auch die oben beschriebene Technik im Schwein eingesetzt wurde, um die neuartige Methodik auch in vivo auf ihre Praktikabilität zu prüfen, bevor es zu einer Anwendung der Ergebnisse im Menschen kommen kann.

Bisher konnten durch Tiermodelle nur Teilaspekte des humanen Blutkreislaufsystems simuliert werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass porcine Thrombozyten im Bezug auf die Verwendung von Kathetermaterial eine ähnliche Adhäsionsfähigkeit an die Kunststoffoberfläche des Katheters zeigen [97]. Dementsprechend groß ist der Bedarf an geeigneten, effizienten Tiermodellen, auch im Bezug auf die Generierung für Behandlungszwecke geeigneter Aneurysmen.

Zu den idealen Merkmalen eines Aneurysmen-Modells gehören: 1.) eine zuverlässige Langzeit-Stabilität des erzeugten Aneurysmas ohne Thrombosierungsneigung, 2.) Ähnlichkeit des Gerinnungssystems der ausgewählten Spezies mit dem des Menschen, 3.) Simulation verschiedener Aneurysmatypen und ihrer spezifischen Hämodynamik, 4.) Vergleichbarkeit der Diameter der verwendeten Gefäße mit denen humaner intrakranieller Gefäße, 5.) Erzeugung des Aneurysmas ohne Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs, 6.) Simulation der Anwendungsgrenzen der Embolisierung von Aneurysmen beim Menschen mit verschiedenen Verfahren [18].

Keines der zurzeit verfügbaren Modelle weist alle notwendigen Merkmale eines idealen Aneurysmen-Modells auf [18]. Aus der Literatur sind ebenfalls die Durchmesser der porcinen peripheren Gefäße bekannt [98], sodass diese zur Simulation humaner zerebraler Arterien genutzt werden können. Es besteht die Notwendigkeit, Fortschritte bei der Entwicklung neuer Aneurysmen-Modelle zu erzielen, um neue Techniken zur Embolisierung entwickeln und neue Materialien testen zu können [18].

Weitere Einsatzgebiete für die Mikro-CT sind beispielsweise die hochauflösende Untersuchung von relativ röntgendichten Objekten wie Zähnen (Abbildung 4 A+B) oder auch die Untersuchung von Insekten (Abbildung 4 C+D) nach Färbung mit röntgenkontrastgebenden Substanzen. Zusätzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe mittels des o. g. Gerätes die zeitlich und räumlich hochauflösende digitale Subtraktionsangiographie (DSA) etabliert, anhand derer selbst bei Mäusen eine aussagekräftige Gefäßbildung erzielt werden kann [76, 77]. In Kooperation mit dem Institut für medizinische Strahlenphysik wurde an unserem Mikro-CT die Bestrahlung von Tumoren sowohl in der Maus [99] als auch in der Ratte etabliert.

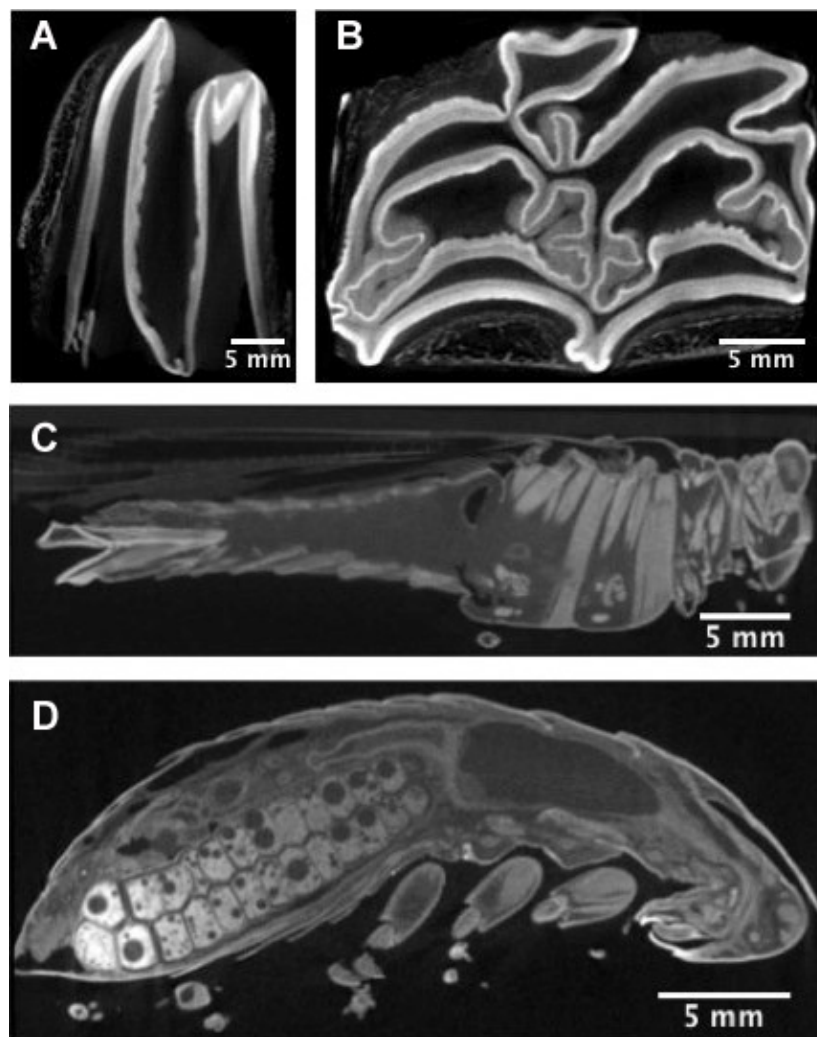


Abbildung 4: Hochauflösende Mikro-CT eines equinen maxillären Molaren aus einer Studie in Kooperation mit Herrn Prof. Staszyk, Institut für Veterinär- Anatomie, Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (**A+B**). Mikro-CT Aufnahmen einer in jodhaltiger Lösung angefärbten Heuschrecke (**C**) und einer in Wolframatophosphorsäure angefärbten Kakerlake (**D**) aus einem Kooperationsprojekt mit Herrn Dr. Dirks aus dem Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme.

Zusammenfassung

Industrielle Röntgendurchleuchtungsgeräte lassen sich für die Untersuchung verschiedenster Fragestellungen anwenden. Das Spektrum der Anwendbarkeit reicht von der hochauflösenden in vivo-Bildgebung von z. B. Glioblastomen, zerebralen Hirngefäßen, abdominalen und thorakalen Organen in der Maus, bis hin zur hochauflösenden Untersuchung von Objekten wie z. B. Stents, Zähnen, Insekten oder auch einzelner Organe ex vivo. Desweiteren zeichnet das hier eingesetzte industrielle Röntgengerät die Möglichkeit zur Strahlentherapie von Tieren aus, was mit herkömmlichen speziellen Kleintier-Computertomographen nicht möglich ist. Ziel dieser Dissertation war zum einen die Etablierung eines Glioblastom-Maus-Modells und anschließend die Überprüfung der Anwendbarkeit eines Mikro-CT für die wiederholte bildgebende Darstellung der Hirntumoren vor und nach Strahlentherapie. Darüber hinaus wurde die Mikro-CT für die Evaluierung sowohl der Verschlussrate von Aneurysmen als auch der artefaktfreien Darstellung der verwendeten Materialien im Modellversuch getestet.

Wir konnten in beiden von uns durchgeführten Studien die Mikro-CT erfolgreich zur Bildgebung anwenden.

Zur Etablierung des Glioblastom-Maus-Modells wurde die gesamte OP-Methode zur Tumorzellimplantation in das Gehirn zunächst an toten Mäusen durchgeführt. Anstatt Zellen wurde eine äquivalente Menge an mit Kontrastmittel vermengter Methylcellulose des später geplanten Injektionsvolumens an Zellen in das Gehirn appliziert. Anschließend wurde zur Erfolgskontrolle eine Röntgenaufnahme im Mikro-CT angefertigt. Anhand der Aufnahmen konnten wir die genaue Lokalisation und Ausdehnung der applizierten Menge beurteilen und unsere OP-Methode gegebenenfalls optimieren. Erst nach verlässlicher Reproduzierbarkeit der OP wurden humane Zellen in vivo in die rechte Hemisphäre von insgesamt 27 NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ Mäusen injiziert. Zwei Wochen nach Xenotransplantation erfolgte eine erste kontrastmittelgestützte Untersuchung im Mikro-CT zur Tumordetektion. Bei negativem Befund wurde bei den Tieren wöchentlich eine weitere Mikro-CT durchgeführt. Tiere mit positivem Befund wurden je nach geplantem Versuch nicht therapiert (n=21) oder mittels Strahlentherapie (n=6) behandelt. Alle Tiere wurden im weiteren Verlauf wöchentlich bis zum Versuchsende im Mikro-CT untersucht. Insgesamt wurden 103 kontrastmittelgestütz-

te Untersuchungen im Mikro-CT durchgeführt. Der maximale Tumordurchmesser und das maximale Tumolvolumen wurden anhand der einzelnen CT-Datensätze bestimmt. Zusätzlich wurden die Gehirne histologisch aufgearbeitet um das maximale Volumen und den maximalen Durchmesser der Tumore anhand der Histologie zu berechnen. Die histologischen Ergebnisse wurden mit der jeweils letzten Mikro-CT (durchgeführt am Tag des Versuchsendes) verglichen. Die hervorragende Korrelation von maximalem Tumordurchmesser und Tumolvolumen ermittelt in der Mikro-CT mit den Ergebnissen aus der Histologie (Tumordurchmesser: 0,929, $p < 0,001$; Tumolvolumen: 0,969, $p < 0,001$, $n = 17$) belegt die hohe Genauigkeit und damit Anwendbarkeit der Mikro-CT für ein Hirntumormodell. Die hohe Sensitivität (0,95) und Spezifität (0,71) belegen zusätzlich die Exaktheit der Mikro-CT zur Erkennung von Gehirntumoren in sehr kleinen Tieren wie Mäusen (PPV=0,91, NPV=0,83).

Die zweite im Rahmen dieser kumulativen Dissertation eingereichte Arbeit befasst sich mit der Evaluation einer neuen Methode zur Embolisation von Aneurysmen. Hierzu wurden Aneurysmen mit einem dicht gewobenem Stent (sog. Flow diverter) überdeckt. Über einen zuvor im Aneurysma platzierten Mikrokatheter wurde das Aneurysma mit Mikropartikeln embolisiert, welche größer als die Maschen des flussmodulierenden Stents sind. Die Mikro-CT konnten wir erfolgreich einsetzen, um mit einer hohen Auflösung die 700–900 μm kleinen Partikel im Aneurysma darzustellen und die komplette Ausfüllung des Aneurysmas zu verifizieren. Auch die Maschen-dichte des Stents im Verhältnis zum Aneurysma konnte mittels Mikro-CT analysiert werden.

Die Möglichkeit der wiederholten Darstellbarkeit von Gehirntumoren im zeitlichen Verlauf mittels Mikro-CT bietet eine Grundlage für weitere Versuchsvorhaben, wie z. B. die Visualisierung morphologischer Veränderungen des Tumors unter verschiedenen Therapieansätzen. Die erfolgreiche Evaluation der Verschlussrate von Aneurysmen mittels einer neuen Technik in der Mikro-CT ist ein wesentlicher Schritt, bevor es zu einer ersten Anwendung im lebenden Tier kommt. Beide hier vorgestellten Arbeiten tragen durch den erfolgreichen Einsatz eines bildgebenden Verfahrens erheblich zur langfristigen Senkung der Versuchstierzahlen bei. Zusammenfassend konnten wir durch die erfolgreiche Anwendung der Mikro-CT in den hier vorgestellten Arbeiten das Spektrum der Anwendbarkeit eines industriellen Mikro-CTs in der präklinischen Forschung deutlich erweitern.

Summary

Micro-CT systems are being used with increasing frequency in preclinical research. The range of examinations includes high-resolution in vivo imaging of glioblastoma, cerebral vessels, abdominal and thoracic organs in mice as well as investigation of other small objects like stents, teeth, insects or single organs ex vivo or in vitro. In addition, micro-CT may be used for radiation therapy of small rodents like mice and rats, as shown in our studies. Aim of this thesis was to establish an orthotopic glioblastoma mouse model and to evaluate the applicability of a micro-CT for repetitive imaging of brain tumors in mice. We furthermore used a micro-CT to evaluate the distribution of microspheres used to treat a silicone aneurysm model.

The glioblastoma mouse model was trained in dead mice first. Instead of tumor cells we first injected methylcellulose mixed with contrast agent to train intracerebral injections. The use of contrast agent allowed us to verify our injection technique by subsequent micro-CT.

After successfully establishing the technique, human brain tumor cells were injected into the right hemisphere of $n = 27$ NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ mice. Two weeks after xenotransplantation mice underwent first contrast-enhanced micro-CT. Animals with negative results in micro-CT received additional micro-CT scans weekly until brain tumors were detected. Animals were left untreated (control group), or were treated with radiation- or chemotherapy. During treatment all animals received weekly micro-CT scans until animals had to be sacrificed. The maximum diameter and volume of intracerebrally growing xenografts were measured. Brains of sacrificed mice were histologically worked up and maximum tumor diameter and tumor volume were measured again. Results from histology were compared to micro-CT data. The excellent correlation between maximum tumor diameter and tumor volume measured in micro-CT and histology (tumor diameter: 0.929, $p < 0.001$; tumor volume: 0.969, $p < 0.001$, $n=17$). Sensitivity and specificity of micro-CT were 0.95 and 0.71, respectively (PPV=0.91, NPV=0.83). This proved the high accuracy of micro-CT for brain tumor detection in animals as small as mice.

The second paper referenced to within this doctoral thesis describes the evaluation of the distribution of microspheres within a silicon aneurysm and the degree of aneurysm occlusion. For this purpose a silicon aneurysm was treated with a densely wo-

ven stent (a so called flow diverter). Additionally, the aneurysm was embolized with microspheres larger than the pores of the stent via a microcatheter previously placed in the aneurysm. Using our micro-CT we were able to visualize the 700-900 μm small microspheres, which allowed us to verify complete embolization of the aneurysm. Furthermore, the mesh density of the flow diverter in relation to the size of the microspheres was analyzed using the micro-CT.

From our findings we conclude, that micro-CT is a versatile tool that may be used for imaging of a vast range of objects and thus propose that micro-CT will be used with increasing frequency in preclinical research.

Literaturverzeichnis

1. DRZE. *Versuchstierzahlen: Deutschland und Europa*. 2015.
2. BMEL, *Trendwende: Erstmals weniger Tiere für wissenschaftliche Versuche verwendet*. 2014.
3. DFG, *Tierversuche in der Forschung*. 2004, Lemmens Verlags- & Mediengesellschaft mbH: Bonn. p. 18.
4. Boll, H., Bag, S., Schambach, S.J., Doyon, F., Nittka, S., Kramer, M., Groden, C., and Brockmann, M.A., *High-speed single-breath-hold micro-computed tomography of thoracic and abdominal structures in mice using a simplified method for intubation*. J Comput Assist Tomogr, 2010. **34**(5): p. 783-90.
5. Boll, H., Nittka, S., Doyon, F., Neumaier, M., Marx, A., Kramer, M., Groden, C., and Brockmann, M.A., *Micro-CT based experimental liver imaging using a nanoparticulate contrast agent: a longitudinal study in mice*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25692.
6. Fomchenko, E.I. and Holland, E.C., *Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5288-97.
7. Tai, Y.C., Chatziioannou, A.F., Yang, Y., Silverman, R.W., Meadors, K., Siegel, S., Newport, D.F., Stickel, J.R., and Cherry, S.R., *MicroPET II: design, development and initial performance of an improved microPET scanner for small-animal imaging*. Phys Med Biol, 2003. **48**(11): p. 1519-37.
8. Lewis, J.S., Achilefu, S., Garbow, J.R., Laforest, R., and Welch, M.J., *Small animal imaging. current technology and perspectives for oncological imaging*. Eur J Cancer, 2002. **38**(16): p. 2173-88.
9. Koo, V., Hamilton, P.W., and Williamson, K., *Non-invasive in vivo imaging in small animal research*. Cell Oncol, 2006. **28**(4): p. 127-39.
10. Koba, W., Kim, K., Lipton, M.L., Jelicks, L., Das, B., Herbst, L., and Fine, E., *Imaging devices for use in small animals*. Semin Nucl Med, 2011. **41**(3): p. 151-65.

11. Fass, L., *Imaging and cancer: a review*. Mol Oncol, 2008. **2**(2): p. 115-52.
12. Del Guerra, A. and Belcari, N., *State-of-the-art of PET, SPECT and CT for small animal imaging*. ScienceDirect, 2007. **583**(1): p. 119-124.
13. Paulus, M.J., Gleason, S.S., Kennel, S.J., Hunsicker, P.R., and Johnson, D.K., *High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research*. Neoplasia, 2000. **2**(1-2): p. 62-70.
14. Huse, J.T. and Holland, E.C., *Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing*. Brain Pathol, 2009. **19**(1): p. 132-43.
15. Huszthy, P.C., Daphu, I., Niclou, S.P., Stieber, D., Nigro, J.M., Sakariassen, P.O., Miletic, H., Thorsen, F., and Bjerkvig, R., *In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives*. Neuro Oncol, 2012. **14**(8): p. 979-93.
16. Simeonova, I. and Huillard, E., *In vivo models of brain tumors: roles of genetically engineered mouse models in understanding tumor biology and use in preclinical studies*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(20): p. 4007-26.
17. de Oliveira, I.A., Mendes Pereira Caldas, J.G., Araujo Oliveira, H., and de Abreu Costa Brito, E., *Development of a new experimental model of saccular aneurysm by intra-arterial incubation of papain in rabbits*. Neuroradiology, 2011. **53**(11): p. 875-81.
18. de Oliveira, I.A., *Main Models of Experimental Saccular Aneurysm in Animals*. INTECH Open Access, 2012.
19. Gabrisch, K., Zwart, P., *Krankheiten der Heimtiere*, L.S. Michael Fehr, Peernel Zwart, Editor. 2015, Schlütersche Verlagsgesellschaft mgH & Co. KG. p. 133.
20. Nguyen, D. and Xu, T., *The expanding role of mouse genetics for understanding human biology and disease*. Dis Model Mech, 2008. **1**(1): p. 56-66.
21. *Advantages of the mouse as a model organism*. 2014; Available from: <http://research.jax.org/mousegenetics/advantages/advantages-of-mouse.html>.

22. Lim, S.K., Llaguno, S.R., McKay, R.M., and Parada, L.F., *Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models*. BMB Rep, 2011. **44**(3): p. 158-64.
23. Acton, P.D. and Kung, H.F., *Small animal imaging with high resolution single photon emission tomography*. Nucl Med Biol, 2003. **30**(8): p. 889-95.
24. Engelhorn, T., Eyupoglu, I.Y., Schwarz, M.A., Karolczak, M., Bruenner, H., Struffert, T., Kalender, W., and Doerfler, A., *In vivo micro-CT imaging of rat brain glioma: a comparison with 3T MRI and histology*. Neurosci Lett, 2009. **458**(1): p. 28-31.
25. Menk, R.H., Schultke, E., Hall, C., Arfelli, F., Astolfo, A., Rigon, L., Round, A., Ataeltmannan, K., MacDonald, S.R., and Juurlink, B.H., *Gold nanoparticle labeling of cells is a sensitive method to investigate cell distribution and migration in animal models of human disease*. Nanomedicine, 2011. **7**(5): p. 647-54.
26. Menichetti, L., Petroni, D., Panetta, D., Burchielli, S., Bortolussi, S., Matteucci, M., Pascali, G., Del Turco, S., Del Guerra, A., Altieri, S., and Salvadori, P.A., *A micro-PET/CT approach using O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine in an experimental animal model of F98 glioma for BNCT*. Appl Radiat Isot, 2011. **69**(12): p. 1717-20.
27. Schwarz, M., Engelhorn, T., Eyupoglu, I.Y., Brunner, H., Struffert, T., Kalender, W., and Dorfler, A., *In vivo imaging of MSCT and micro-CT: a comparison*. Rofo, 2010. **182**(4): p. 322-6.
28. Park, S.S., Chunta, J.L., Robertson, J.M., Martinez, A.A., Oliver Wong, C.Y., Amin, M., Wilson, G.D., and Marples, B., *MicroPET/CT imaging of an orthotopic model of human glioblastoma multiforme and evaluation of pulsed low-dose irradiation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011. **80**(3): p. 885-92.
29. Lee, D.Y., Chunta, J.L., Park, S.S., Huang, J., Martinez, A.A., Grills, I.S., Krueger, S.A., Wilson, G.D., and Marples, B., *Pulsed versus conventional radiation therapy in combination with temozolomide in a murine orthotopic*

- model of glioblastoma multiforme*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. **86**(5): p. 978-85.
30. Dilworth, J.T., Krueger, S.A., Dabjan, M., Grills, I.S., Torma, J., Wilson, G.D., and Marples, B., *Pulsed low-dose irradiation of orthotopic glioblastoma multiforme (GBM) in a pre-clinical model: effects on vascularization and tumor control*. Radiother Oncol, 2013. **108**(1): p. 149-54.
 31. Kepshire, D.S., Gibbs-Strauss, S.L., O'Hara, J.A., Hutchins, M., Mincu, N., Leblond, F., Khayat, M., Dehghani, H., Srinivasan, S., and Pogue, B.W., *Imaging of glioma tumor with endogenous fluorescence tomography*. J Biomed Opt, 2009. **14**(3): p. 030501.
 32. Greschus, S., Kiessling, F., Lichy, M.P., Moll, J., Mueller, M.M., Savai, R., Rose, F., Ruppert, C., Gunther, A., Luecke, M., Fusenig, N.E., Semmler, W., and Traupe, H., *Potential applications of flat-panel volumetric CT in morphologic and functional small animal imaging*. Neoplasia, 2005. **7**(8): p. 730-40.
 33. Bag, S., Schambach, S.J., Boll, H., Schilling, L., Groden, C., and Brockmann, M.A., *[Current concepts for experimental micro-CT in small animals]*. Rofo, 2010. **182**(5): p. 390-403.
 34. Schambach, S.J., Bag, S., Schilling, L., Groden, C., and Brockmann, M.A., *Application of micro-CT in small animal imaging*. Methods, 2010. **50**(1): p. 2-13.
 35. Ritman, E.L., *Current status of developments and applications of micro-CT*. Annu Rev Biomed Eng, 2011. **13**: p. 531-52.
 36. Ritman, E.L., *Micro-computed tomography-current status and developments*. Annu Rev Biomed Eng, 2004. **6**: p. 185-208.
 37. Flohr, T., *Wie funktioniert CT?* 2011, Springer-Verlag Berlin Heidelberg p. 15-21.

38. Kagadis, G.C., Loudos, G., Katsanos, K., Langer, S.G., and Nikiforidis, G.C., *In vivo small animal imaging: current status and future prospects*. Med Phys, 2010. **37**(12): p. 6421-42.
39. Krieger, H., *Strahlungsquellen für Technik und Medizin*. Vol. 2. Auflage. 2013, Wiesbaden: Springer Spektrum. 17-49.
40. Schlungbaum, W., Flesch, U., and Stabell, U., *Medizinische Strahlenkunde*. Vol. 7., vollständig überarbeitete Auflage. 1993: De Gruyter.
41. Fiebig, A.T., *Entwicklung, Testung und Verwendung eines artefaktfreien Ports für die Maus zur wiederholten intravaskulären Injektion*. 2013, Veterinärmedizinische Dissertation. Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen.
42. *Flat-Panel Detectors Revolutionizing X-Ray Imaging*. 2004, Varian Medical Systems. p. 14-17.
43. Rowlands, J.A., Zhao, W., Blevis, I.M., Waechter, D.F., and Huang, Z., *Flat-panel digital radiology with amorphous selenium and active-matrix readout*. Radiographics, 1997. **17**(3): p. 753-60.
44. Hermann, K.-P., *Röntgenmammographie Verstehen, anwenden und optimieren*. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag Stuttgart 13-17.
45. Kalender, W.A., *Der Einsatz von Flachbilddetektoren für die CT-Bildgebung*. Der Radiologe, 2003. **43**(5): p. 379-387.
46. Kalender, W.A., *Computertomographie*. Vol. 2. Auflage. 2006, Erlangen: Publicis Erlangen.
47. Saito, S. and Murase, K., *Ex vivo imaging of mouse brain using micro-CT with non-ionic iodinated contrast agent: a comparison with myelin staining*. Br J Radiol, 2012. **85**(1019): p. e973-8.
48. de Crespigny, A., Bou-Reslan, H., Nishimura, M.C., Phillips, H., Carano, R.A., and D'Arceuil, H.E., *3D micro-CT imaging of the postmortem brain*. J Neurosci Methods, 2008. **171**(2): p. 207-13.

49. Kirschner, S., Felix, M.C., Hartmann, L., Bierbaum, M., Maros, M.E., Kerl, H.U., Wenz, F., Glatting, G., Kramer, M., Giordano, F.A., and Brockmann, M.A., *In vivo micro-CT imaging of untreated and irradiated orthotopic glioblastoma xenografts in mice: capabilities, limitations and a comparison with bioluminescence imaging*. J Neurooncol, 2015.
50. Nonn, A., Kirschner, S., Figueiredo, G., Kramer, M., Nikoubashman, O., Pjontek, R., Wiesmann, M., and Brockmann, M.A., *Feasibility, Safety, and Efficacy of Flow-Diverting Stent-Assisted Microsphere Embolization of Fusiform and Sidewall Aneurysms*. Neurosurgery, 2015. **77**(1): p. 126-36.
51. Huang, M., Xiong, C., Lu, W., Zhang, R., Zhou, M., Huang, Q., Weinberg, J., and Li, C., *Dual-modality micro-positron emission tomography/computed tomography and near-infrared fluorescence imaging of EphB4 in orthotopic glioblastoma xenograft models*. Mol Imaging Biol, 2014. **16**(1): p. 74-84.
52. GEKID, *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Häufigkeiten und Trends. Vol. 9. 2013.
53. Janbazian, L., Karamchandani, J., and Das, S., *Mouse models of glioblastoma: lessons learned and questions to be answered*. J Neurooncol, 2014. **118**(1): p. 1-8.
54. Kaye, A.H., Morstyn, G., Gardner, I., and Pyke, K., *Development of a xenograft glioma model in mouse brain*. Cancer Res, 1986. **46**(3): p. 1367-73.
55. Snyder, J.M., Shofer, F.S., Van Winkle, T.J., and Massicotte, C., *Canine intracranial primary neoplasia: 173 cases (1986-2003)*. J Vet Intern Med, 2006. **20**(3): p. 669-75.
56. Adamo, P.F., Forrest, L., and Dubielzig, R., *Canine and Feline Meningiomas: Diagnosis, Treatment, and Prognosis*. Compendium, 2004. **December 2004**: p. 951-966.
57. Garcia, P.A., Pancotto, T., Rossmeisl, J.H., Jr., Henao-Guerrero, N., Gustafson, N.R., Daniel, G.B., Robertson, J.L., Ellis, T.L., and Davalos, R.V., *Non-thermal irreversible electroporation (N-TIRE) and adjuvant fractionated*

- radiotherapeutic multimodal therapy for intracranial malignant glioma in a canine patient*. Technol Cancer Res Treat, 2011. **10**(1): p. 73-83.
58. Heidner, G.L., Kornegay, J.N., Page, R.L., Dodge, R.K., and Thrall, D.E., *Analysis of survival in a retrospective study of 86 dogs with brain tumors*. J Vet Intern Med, 1991. **5**(4): p. 219-26.
 59. Brearley, M.J., Jeffery, N.D., Phillips, S.M., and Dennis, R., *Hypofractionated radiation therapy of brain masses in dogs: a retrospective analysis of survival of 83 cases (1991-1996)*. J Vet Intern Med, 1999. **13**(5): p. 408-12.
 60. Spugnini, E.P., Thrall, D.E., Price, G.S., Sharp, N.J., Munana, K., and Page, R.L., *Primary irradiation of canine intracranial masses*. Vet Radiol Ultrasound, 2000. **41**(4): p. 377-80.
 61. Khanna, C., London, C., Vail, D., Mazcko, C., and Hirschfeld, S., *Guiding the optimal translation of new cancer treatments from canine to human cancer patients*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(18): p. 5671-7.
 62. Dickinson, P.J., LeCouteur, R.A., Higgins, R.J., Bringas, J.R., Larson, R.F., Yamashita, Y., Krauze, M.T., Forsayeth, J., Noble, C.O., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Park, J.W., Berger, M.S., and Bankiewicz, K.S., *Canine spontaneous glioma: a translational model system for convection-enhanced delivery*. Neuro Oncol, 2010. **12**(9): p. 928-40.
 63. Stoica, G., Kim, H.-T., Hall, D.G., and Coates, J.R., *Morphology, Immunohistochemistry, and Genetic Alterations in Dog Astrocytomas* Vet Pathol, 2004. **41**.
 64. Candolfi, M., Curtin, J.F., Nichols, W.S., Muhammad, A.G., King, G.D., Pluhar, G.E., McNiel, E.A., Ohlfest, J.R., Freese, A.B., Moore, P.F., Lerner, J., Lowenstein, P.R., and Castro, M.G., *Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression*. J Neurooncol, 2007. **85**(2): p. 133-48.
 65. Rossmeisl, J.H., *New treatment modalities for brain tumors in dogs and cats*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2014. **44**(6): p. 1013-38.

66. Paoloni, M. and Khanna, C., *Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(2): p. 147-56.
67. Evans, S.M., Dayrell-Hart, B., Powlis, W., Christy, G., and VanWinkle, T., *Radiation therapy of canine brain masses*. J Vet Intern Med, 1993. **7**(4): p. 216-9.
68. Moore, A.S., *Radiation therapy for the treatment of tumours in small companion animals*. Vet J, 2002. **164**(3): p. 176-87.
69. Bley, C.R., Sumova, A., Roos, M., and Kaser-Hotz, B., *Irradiation of brain tumors in dogs with neurologic disease*. J Vet Intern Med, 2005. **19**(6): p. 849-54.
70. Motta, L., Mandara, M.T., and Skerrett, G.C., *Canine and feline intracranial meningiomas: an updated review*. Vet J, 2012. **192**(2): p. 153-65.
71. Turrel, J.M., Fike, J.R., LeCouteur, R.A., Pflugfelder, C.M., and Borcich, J.K., *Radiotherapy of brain tumors in dogs*. J Am Vet Med Assoc, 1984. **184**(1): p. 82-6.
72. Gorlia, T., van den Bent, M.J., Hegi, M.E., Mirimanoff, R.O., Weller, M., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Belanger, K., Brandes, A.A., Allgeier, A., Lacombe, D., and Stupp, R., *Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3*. Lancet Oncol, 2008. **9**(1): p. 29-38.
73. Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.O., European Organisation for, R., Treatment of Cancer Brain, T., Radiation Oncology, G., and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 459-66.

74. Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J.P., Sabel, M., Combs, S.E., Vesper, J., Braun, C., Meixensberger, J., Ketter, R., Mayer-Steinacker, R., Reifenberger, G., Weller, M., and Society, N.O.A.S.G.o.N.-o.W.G.o.G.C., *Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(7): p. 707-15.
75. Kumar, A.J., Leeds, N.E., Fuller, G.N., Van Tassel, P., Maor, M.H., Sawaya, R.E., and Levin, V.A., *Malignant gliomas: MR imaging spectrum of radiation therapy- and chemotherapy-induced necrosis of the brain after treatment*. *Radiology*, 2000. **217**(2): p. 377-84.
76. Figueiredo, G., Boll, H., Kramer, M., Groden, C., and Brockmann, M.A., *In vivo X-ray digital subtraction and CT angiography of the murine cerebrovasculature using an intra-arterial route of contrast injection*. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2012. **33**(9): p. 1702-9.
77. Figueiredo, G., Brockmann, C., Boll, H., Heilmann, M., Schambach, S.J., Fiebig, T., Kramer, M., Groden, C., and Brockmann, M.A., *Comparison of digital subtraction angiography, micro-computed tomography angiography and magnetic resonance angiography in the assessment of the cerebrovascular system in live mice*. *Clin Neuroradiol*, 2012. **22**(1): p. 21-8.
78. Swain, M.V. and Xue, J., *State of the art of Micro-CT applications in dental research*. *Int J Oral Sci*, 2009. **1**(4): p. 177-88.
79. Shaha, R.K., Vogt, J.R., Han, C.S., and Dillon, M.E., *A micro-CT approach for determination of insect respiratory volume*. *Arthropod Struct Dev*, 2013. **42**(5): p. 437-42.
80. Metscher, B.D., *MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues*. *BMC Physiol*, 2009. **9**: p. 11.
81. Tanweer, O., Wilson, T.A., Metaxa, E., Riina, H.A., and Meng, H., *A comparative review of the hemodynamics and pathogenesis of cerebral and*

- abdominal aortic aneurysms: lessons to learn from each other.* J Cerebrovasc Endovasc Neurosurg, 2014. **16**(4): p. 335-49.
82. Brisman, J.L., Song, J.K., and Newell, D.W., *Cerebral aneurysms.* N Engl J Med, 2006. **355**(9): p. 928-39.
83. Schievink, W.I., *Intracranial aneurysms.* N Engl J Med, 1997. **336**(1): p. 28-40.
84. Cinar, C., Bozkaya, H., and Oran, I., *Endovascular treatment of cranial aneurysms with the pipeline flow-diverting stent: preliminary mid-term results.* Diagn Interv Radiol, 2013. **19**(2): p. 154-64.
85. Murayama, Y., Nien, Y.L., Duckwiler, G., Gobin, Y.P., Jahan, R., Frazee, J., Martin, N., and Vinuela, F., *Guglielmi detachable coil embolization of cerebral aneurysms: 11 years' experience.* J Neurosurg, 2003. **98**(5): p. 959-66.
86. *Deutsche Gesellschaft für Neuroradiologie. Leitlinie Subarachnoidalblutung, Entwicklungsstufe: S1.* 2012, AWMF online Portal.
87. Fankhauser, R., Luginbuhl, H., and McGrath, J.T., *Cerebrovascular disease in various animal species.* Ann N Y Acad Sci, 1965. **127**(1): p. 817-60.
88. Ploeg, M., Saey, V., de Bruijn, C.M., Grone, A., Chiers, K., van Loon, G., Ducatelle, R., van Weeren, P.R., Back, W., and Delesalle, C., *Aortic rupture and aorto-pulmonary fistulation in the Friesian horse: characterisation of the clinical and gross post mortem findings in 24 cases.* Equine Vet J, 2013. **45**(1): p. 101-6.
89. Shirai, W., Momotani, E., Sato, T., Kashima, T., Saito, T., and Itoi, Y., *Dissecting aortic aneurysm in a horse.* J Comp Pathol, 1999. **120**(3): p. 307-11.
90. Oyamada T., S.K., Park C.-H., Katayama Y., Oikawa M., *Pathology of Aortic-Iliac Thrombosis in Two Horses.* J. Equine Sci., 2007. **18**: p. 59-65.
91. Greator, J.C., *Diagnosis and treatment of "verminous aneurysm" formation in the horse.* Vet Rec, 1977. **101**(10): p. 184-7.

92. Miller, D.L., Schrecengost, J., Kilgo, J., Ray, H.S., and Miller, K.V., *Ruptured aortic aneurysm in a coyote (Canis latrans) from South Carolina*. J Zoo Wildl Med, 2007. **38**(3): p. 492-4.
93. Angelos, J.A., Anderson, B.H., Waurzyniak, B.J., Ames, T.R., and Turner, T.A., *Aneurysm of the cranial mesenteric artery in a cow*. J Am Vet Med Assoc, 1995. **207**(5): p. 623-5.
94. Steverink, P.J., Kuiper, R., and Gruys, E., *Aneurysm of the cranial mesenteric artery in a cow*. Vet Rec, 1995. **136**(3): p. 69-72.
95. Bertolini, G., *Incidental Intracranial Aneurysm in a Dog Detected by 16-Multidetector Row Computed Tomography Angiography*. Case Reports in Veterinary Medicine, 2013. **2013**.
96. Stehbens, W.E., *Cerebral aneurysms of animals other than man*. J Pathol Bacteriol, 1963. **86**: p. 160-8.
97. Grabowski, E.F., Didisheim, P., Lewis, J.C., Franta, J.T., and Stropp, J.Q., *Platelet adhesion to foreign surfaces under controlled conditions of whole blood flow: human vs rabbit, dog, calf, sheep, pig, macaque, and baboon*. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1977. **23**: p. 141-51.
98. Müller, C., *Computertomographisch gestützte Makro- und Mikromorphometrie von Blutgefäßen des Göttingen Minipigs®*. 2011, Veterinärmedizinische Dissertation. Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.
99. Felix, M.C., Fleckenstein, J., Kirschner, S., Hartmann, L., Wenz, F., Brockmann, M.A., Glatting, G., and Giordano, F.A., *Image-Guided Radiotherapy Using a Modified Industrial Micro-CT for Preclinical Applications*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126246.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marc Brockmann für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer danke ich besonders für die Betreuung meiner externen Dissertation sowie für die Korrektur meiner Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Dr. Christoph Groden danke ich für die großzügige Förderung aller Forschungsvorhaben, an denen ich beteiligt sein durfte.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Frank Giordano für die exzellente Kooperation im Rahmen unserer gemeinsamen Forschungsprojekte danken.

Ebenfalls herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Anna Teresa Fiebig für die ausgezeichnete Einarbeitung am Mikro-CT bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich immer unterstützt und ermutigt hat und mir mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Schlussendlich danke ich all meinen lieben Freunden und Kollegen, die mich auf ganz unterschiedliche Weise während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Vielen herzlichen Dank an alle!

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Stefanie Kirschner